

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Tese

Estimativa da diversidade genética do peixe-rei (*Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*) por marcadores de microssatélite e CYTB nas lagoas Mirim e Mangueira no Rio Grande do Sul

Daiane Machado Souza

Pelotas, 2020

Daiane Machado Souza

Estimativa da diversidade genética do peixe-rei (*Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*) por marcadores de microssatélite e CYTB nas lagoas Mirim e Mangueira no Rio Grande do Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Heden Luiz Marques Moreira

Coorientador: Rafael Aldrighi Tavares

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S719e Souza, Daiane Machado

Estimativa da diversidade genética do peixe-rei (*Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*) por marcadores de microssatélite e CYTB nas lagoas Mirim e Mangueira no Rio Grande do Sul / Daiane Machado Souza ; Heden Luiz Marques Moreira, orientador ; Rafael Aldrighi Tavares, coorientador. — Pelotas, 2020.

58 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Peixe-rei. 2. Marcador microssatélite. 3. Citocromo b.
I. Moreira, Heden Luiz Marques, orient. II. Tavares, Rafael Aldrighi, coorient. III. Título.

CDD : 597.092081658

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Daiane Machado Souza

Estimativa da diversidade genética do peixe-rei (*Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*) por marcadores de microssatélite e CYTB nas lagoas Mirim e Mangueira no Rio Grande do Sul

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28 de fevereiro de 2020.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Heden Luiz Marques Moreira (Orientador)

Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Prof. Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras

Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

Pós-Dr. Nelson José Laurino Dionello

Pós Doutor em Melhoramento Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Prof.^a Dra Carla Giovane Ávila Moreira

Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Prof.^a Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha

Doutora em Ciência e Tecnologia de sementes pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

**Dedico este trabalho aos meus pais, Neuza e
Cleudimar.**

Agradecimentos

Muitas pessoas foram essenciais para que este trabalho fosse iniciado, executado e concluído. Sozinho ninguém sai do zero, ninguém faz nada bem feito. Ter alguém por perto que compartilhe ideias, soluções e ações faz toda diferença, e nesta tese tem um pouquinho ou muito de cada uma destas pessoas. Então gostaria de deixar claro que este “trabalho” não é só meu e que várias pessoas merecem ser parabenizadas por ele.

Em primeiro lugar agradeço a minha família, que é minha base, meu porto seguro, além de serem meus parceiros de degustação durante os projetos.

Ao meu pai que foi e é minha fonte de muitos dos meus materiais de coleta, informações e conhecimento empírico (minha inspiração).

Ao meu companheiro, parceiro e amigo William por segurar a barra, me apoiar e me incentivar durante toda essa longa jornada.

Ao meu sempre orientador, professor Sérgio Piedras, que me orientou na graduação, mestrado e foi quem me deu um empurrãozinho para entrar nessa área de genética, idealizou e batizou esta tese.

Ao meu orientador de doutorado, Heden Moreira que me aceitou com o doutorado em andamento e sempre esteve disposto a ajudar nas rotinas de laboratório e demais fases do estudo.

Ao meu coorientador Rafael Aldrighi que me socorreu em muitos momentos, mas principalmente nesta fase final.

Agradeço muito também a Carla Moreira, que mesmo com a correria de suas atividades ajudou demais na execução deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório LAPEA, nem tenho palavras para agradecer a ajuda de todos vocês.

Agradeço também ao departamento, funcionários, a CAPES e à universidade pelo espaço e apoio necessário.

Mas não poderia deixar de agradecer e dedicar umas palavras a mais para uma pessoa que foi minha guia durante todo o doutorado, Suzane, jamais poderei agradecer todo auxílio, ações, ideias, paciência, explicações...que me deste. Tu tens o dom da gentileza e da didática. Obrigada por tudo!

E por fim, agradeço a todos que participaram e aos amigos que estiveram ao meu lado neste processo.

Muito Obrigada!

Resumo

SOUZA, Daiane Machado. **Estimativa da diversidade genética do peixe-rei (*Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*) por marcadores de microssatélite e CYTB nas lagoas Mirim e Mangueira no Rio Grande do Sul.** 2020. 58f. Tese (Doutorado em Ciência animal) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Apesar da diversidade de peixes e da sua grande importância econômica para o homem, ainda pouco se conhece sobre suas características biológicas, ecológicas e genéticas. A falta de conhecimento das espécies e consequentemente a falta de manejo destas, além das altas taxas de pesca são os principais responsáveis da perda de diversidade e reduções drásticas nas populações. Este trabalho teve como objetivo, caracterizar geneticamente populações de peixe-rei, de duas lagoas, através de análises genéticas de polimorfismo através marcadores microssatélites e mitocondriais. A primeira parte do estudo foi realizada em duas lagoas, Mirim e Mangueira, localizadas no sul do Brasil de onde foram obtidas amostras de *Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*. Foram sintetizados *primers* para a amplificação de seis *loci* microssatélites os quais foram validados e apresentaram alto polimorfismo nas populações. Foram obtidos no total 38 alelos e apenas uma população está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na segunda parte do estudo foram coletadas amostras de peixe-rei na lagoa Mangueira, que morfologicamente eram diferentes das espécies puras. O *locus* UFPEL_OH3 se mostrou um *primer* diagnóstico para a detecção de híbridos de peixe-rei. Foi sintetizado um conjunto de *primers* para amplificação de um fragmento do gene mitocondrial *cytb* para para confrontar as sequências mitocondriais das amostras em estudo e com sequências preservadas de *Odontesthes* do banco genético GenBank. O estudo sugere que possam estar ocorrendo eventos de especiação no ambiente, talvez associados a mudanças ambientais e efeito de sobrepesca nas lagoas em estudo, sendo necessária a elaboração de projetos de conservação e manejo da espécie.

Palavras-chave: citocromo b. loco. molecular. peixe

Abstract

SOUZA, Daiane Machado. **Estimation of the genetic diversity of silverside (*Odontesthes humensis* and *Odontesthes bonariensis*) by microsatellite markers and CYTB in Mirim and Mangueira lagoons in Rio Grande do Sul.** 2020. 58f. Tese (Doutorado em Ciência animal) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Despite the diversity of fish and their great economic importance for man, little is known about their biological, ecological and genetic characteristics. The lack of knowledge of the species and consequently the lack of management of these, in addition to the high rates of fishing are the main responsible for the loss of diversity and drastic reductions in the populations. The objective of this work was to genetically characterize populations of silverside, from two lagoons, through genetic analyzes of polymorphism using microsatellite and mitochondrial markers. The first part of the study was carried out in two lagoons, Mirim and Mangueira, located in southern Brazil from where samples of *Odontesthes humensis* and *Odontesthes bonariensis* were obtained. Six microsatellite loci were synthesized which were validated and showed high polymorphism in the populations. A total of 38 alleles were obtained and only one population is in Hardy-Weinberg equilibrium. In the second part of the study, samples of silverside were collected in the Mangueira lagoon, which were morphologically different from pure species. The UFPEL_OH3 locus proved to be a diagnostic primer for the detection of silverside hybrids. Mitochondrial marker (cyt b) was synthesized to compare the mitochondrial sequences of the samples under study and with preserved *Odontesthes* sequences from the GenBank genetic bank. The study suggests that speciation events may be occurring in the environment, perhaps associated with environmental changes and the effect of overfishing in the ponds under study, requiring the elaboration of conservation and management projects for the species.

Key words: cytochrome b. *locus*. molecular. fish

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1 Perfil eletroforético registrado sob luz UV em fotodocumentador, em gel de poliacrilamida 12% evidenciando o polimorfismo do *locus* UFPEL_OH4, conforme peso molecular..... 33

Artigo 2

- Figura 1 Peixe-rei. (A) *O. humensis*; (B) híbrido; (C) *O. bonariensis*..... 44
- Figura 2 Gel de poliacrilamida 12%, expondo o polimorfismo do *locus* UFPEL_OH3 em *O. bonariensis*, *O. humensis* e híbridos..... 46
- Figura 3 Árvore filogenética mostrando as distâncias genéticas entre espécies do gênero *Odontesthes* do banco de dados GenBank e de amostras coletadas na Lagoa Mangueira, RS -Brasil..... 48

Lista de Tabelas

Artigo

1

Tabela 1	<i>Loci</i> microssatélites, sequências e temperatura de anelamento dos primers e tamanho do fragmento esperados para análise da variabilidade genética de populações de peixe-rei.....	32
Tabela 2	Varição alélica do peixe-rei nas lagoas Mirim e Mangueira, Brasil.....	34
Tabela 3	Frequência alélica de <i>O. bonariensis</i> e <i>O. humensis</i> em dois locais de estudo.....	34
Tabela 4	Análise da variação genética de <i>O. humensis</i> e <i>O. bonariensis</i> em dois locais de amostragem, lagoa Mirim e lagoa Mangueira, Brasil.....	35

Artigo

2

Tabela 1	Sequência dos primers, (T_m^2 °C) temperatura de anelamento, (N° alelos) número de alelos por <i>locus</i> , (Het) número de heterozigotos, (Homo) número de homozigotos.....	47
Tabela 2	Sítios de variação de sequências mitocondriais das amostras em estudo (<i>O. humensis</i> , 1 ao 5; Híbrido, 2 ao 5; <i>O. bonarisensis</i> , 1 ao 5) confrontada com sequências conservadas de <i>Odontesthes</i> do banco de dados genético GenBank.....	47

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Desenvolvimento	13
2.1. Diversidade genética.....	13
2.2. Marcadores microssatélites	13
2.3. Gene mitocondrial do citocromo b (<i>CYTB</i>).....	14
2.4. <i>Odontesthes</i> sp.	14
2.5. Híbridos.....	15
3. Objetivos e metas.....	16
3.1. Objetivo geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
3.3. Metas	16
4. Projeto.....	17
5. ARTIGO 1.....	28
6. ARTIGO 2.....	41
7. Conclusão geral	53
Referências	54

INTRODUÇÃO

Grande parte da biodiversidade do mundo é de origem evolutiva recente e é sustentada por adaptações divergentes em ambientes heterogêneos (HASSELMAN *et al.*, 2014). A variação ou diversidade genética em um organismo aumenta a capacidade de adaptação às mudanças que ocorrem no ambiente e é indispensável para a sobrevivência da espécie (PETERSEN *et al.*, 2012), essas mutações ou polimorfismos, ocorrem devido a operações celulares normais ou em conjunto com outras forças evolutivas, como seleção e deriva genética, levando à diferenciação no nível da população, entre indivíduos ou espécies (CHAUHAN; RAJIV, 2010).

O monitoramento ao nível de genoma utilizando marcadores moleculares é fundamental para compreender a estrutura e a variabilidade genética de populações naturais de peixes, sendo os marcadores microssatélites ferramentas primárias para detectar a singularidade genética de indivíduos. Os resultados obtidos com o uso de marcadores genéticos têm variada aplicação em pesquisas populacionais, sobre evolução, conservação e manejo de recursos naturais e programas de melhoramento genético (CHAUHAN; RAJIV, 2010).

Os marcadores microssatélites foram desenvolvidos na década de 1990, e desde então descobriu-se um poderoso meio para descrever a variação genética em *loci* nucleares, sendo possível a detecção de gargalos ocorridos no passado e tornando possível estimar o tamanho efetivo populacional atual a partir de uma única amostra, expondo a riqueza de *loci* que melhoraram acintosamente a capacidade de estimar as características genéticas e populacionais em diferentes espécies, que se constituem em parâmetros importantes para o estabelecimento de estratégias de conservação (ALLENDORF, 2017). Na atualidade, os estudos em genética de populações permitem detectar regiões do genoma que são afetadas pela seleção natural, como por exemplo características referentes às adaptações ao ambiente, hibridação, depressão demográfica e endogamia, como também por fatores antropogênicos.

Conhecido comercialmente, o peixe-rei possui excelente valor de mercado e é bastante explorado na pesca comercial, além de ser modelo experimental para o estudo da determinação sexual e endocrinologia em peixes (SOMOZA *et al.*, 2008; INAZAWA *et al.*, 2011; FERNANDINO *et al.*, 2015; RUEDA *et al.*, 2016), porém são poucos os estudos acerca da diversidade genética desta espécie em ambiente

natural. De acordo com García *et al.* (2014), dez espécies do gênero *Odontesthes* são endêmicas de uma região de pequenos lagos rasos de água doce espalhados ao longo da planície costeira do Oceano Atlântico Oeste Ocidental, assim como também algumas espécies ocorrem em regiões marítimas.

Baseado em relatos de pescadores que exercem a profissão há décadas, na região de ocorrência do peixe-rei foram observadas características morfológicas conflitantes com a de espécies puras nativas. De acordo com Prado *et al.* (2012), o cruzamento natural interespecífico ocorre com mais frequência em peixes do que em outros vertebrados, e embora exista a suposição de que a hibridação tenha pouca influência na especiação e evolução, os híbridos podem estar envolvidos no surgimento de novas linhagens e no fluxo gênico. A detecção precisa de híbridos usando métodos moleculares depende dos marcadores utilizados e do grau de diferenciação entre as espécies parentais (HASSELMAN *et al.*, 2014; PORTO-FORESTI *et al.*, 2013; HASHIMOTO *et al.*, 2013).

A hibridação pode, de certa forma, ameaçar a biodiversidade concorrendo de várias maneiras com a linhagem parental nativa (HASHIMOTO *et al.*, 2010; HASHIMOTO *et al.*, 2011), mas por outro lado, pode gerar diversidade aumentando o potencial adaptativo de indivíduos misturados com novas variações genéticas (PRADO *et al.*, 2011).

Este estudo tem como objetivo analisar a diversidade genética de populações naturais de peixe-rei (gênero *Odontesthes*) do sul do Brasil, e assim obter uma melhor elucidação a respeito da estruturação genético-populacional da espécie, contribuindo para o desenvolvimento de projetos de conservação e manejo, auxiliando na administração e legislação de pesca que visam a conservação em longo prazo dos recursos pesqueiros naturais.

DESENVOLVIMENTO

2.1. Diversidade genética

Indivíduos semelhantes morfologicamente de uma mesma espécie podem não ser geneticamente idênticos, suas sequências de DNA diferem em algum momento e essas diferenças formam a diversidade genética, conhecida como polimorfismo. A diversidade genética possibilita que uma espécie tenha a capacidade de se adaptar e responder às mudanças ambientais.

O polimorfismo é detectado com a ocorrência e o desaparecimento de variantes genéticas (alelos). Novos alelos aparecem a cada geração de forma espontânea (mutação) devido a erros de replicação do DNA e a diversidade genética é caracterizada pela perda ou fixação destes alelos (ELLENGREN; GALTIER, 2016).

A diversidade genética também sofre influência em relação a biologia e a ecologia das espécies, e estratégias de sobrevivência repercutem a curto ou longo prazo na bagagem genética dos indivíduos. Espécies de vida longa e de baixa fecundidade ou espécies de vida curta e altamente fecundas, de grande ou pequeno porte, podem ter estratégias de segregação de diversidade gênica diferentes (ROMIGUIER *et al.*, 2014).

2.2. Marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites são sequências simples repetidas (SSR), também conhecidos como repetições curtas em *tandem* (STR), consistindo em unidades mono, di, tri e tetra, penta e hexanucleotídeos, distribuídos em todo o genoma, especialmente na eucromatina de eucariotos e no DNA nuclear e organelar codificante e não codificador (ABDUL-MUNEER, 2014). Na região gênica existe menor ocorrência de SSRs, devido aos SSRs apresentarem alta taxa de mutação, a qual pode comprometer a expressão dos genes.

O polimorfismo é detectado através das variações no número de repetições da sequência *motif*, essas variações são causadas pelo deslizamento da fita da polimerase na replicação do DNA ou por erros de recombinação, e podem ser diferenciados com precisão através de observação direta no gel de poliacrilamida.

Os SSRs podem ser classificados de acordo com a composição da sequência obtida, sendo: perfeito se composto inteiramente de repetições de um único motivo; imperfeito se ocorrer um par de bases não pertencente ao motivo entre repetições; interrompido se uma sequência de alguns pares de bases é inserida no motivo ou composto se formado por múltiplos motivos adjacentes e repetitivos (VIEIRA *et al.*, 2016).

Os microssatélites têm sido os marcadores mais amplamente utilizados para genotipagem nos últimos trinta anos, porque são marcadores genéticos altamente informativos, codominantes e multialelos. Esses marcadores são extremamente úteis em estudos de estrutura populacional, mapeamento genético e processos evolutivos (CHAUHAN; RAJIV, 2010).

2.3. Gene mitocondrial do citocromo B (CYTB)

A identificação de marcadores moleculares polimórficos é um requisito crítico na investigação para determinar variação genética e divergência (LUHARIYA *et al.*, 2012). A análise do DNA mitocondrial, isoladamente ou em combinação com outros marcadores nucleares, como microssatélites, é amplamente utilizada no estudo da estrutura populacional e filogenética de espécies animais, pois apresenta herança materna e o repertório de genes codificados é extremamente conservado (AZIZ *et al.*, 2015; SATOH *et al.*, 2016).

Marcadores mitocondriais são amplamente utilizados em estudos sobre peixes e um grande número de primers universais estão disponíveis para amplificar diferentes fragmentos do genoma mitocondrial de muitas espécies de peixes, não parece sofrer recombinação e evolui cerca de dez vezes mais rápido que o genoma nuclear (KOCHZIUS, 2009). O gene *CYTB* faz parte de um complexo de genes envolvidos na fosforilação oxidativa (LINACRE; LEE, 2016).

2.4. *Odontesthes* sp.

O peixe-rei é um peixe neotropical, com ampla ocorrência na América do Sul, sendo que, no estuário da lagoa de Patos, como também em sua área costeira marinha, ocorrem *O. argentinensis* e *O. incisa*, enquanto nos habitats de água doce do sistema lagunar Patos-Mirim podem ser encontrados *O. bonariensis*, *O. humensis*,

O. retropinnis e *O. perugiae*. A maioria das espécies de *Odontesthes* representa recursos economicamente importantes para a pesca artesanal e recreativa e particularmente *O. bonariensis* mostra um grande potencial para o desenvolvimento da aquicultura. A identificação de espécies ecológicas incipientes representa uma oportunidade para investigar o atual processo evolutivo no qual estão associadas divergência adaptativa e isolamento reprodutivo (GARCÍA *et al.*, 2014).

2.5. Híbridos

Embora o surgimento de híbridos ocorra naturalmente durante a evolução e apesar do pressuposto comum de que a hibridação tem pouca influência na especiação e fluxo gênico, o cruzamento natural ocorre mais frequentemente em peixes do que em outros vertebrados (PRADO *et al.*, 2012). Além disso, atividades humanas com resultados diretos ou indiretos afetam positivamente os eventos de hibridação. Assim, a tendência das populações de formar associações de habitat micro geográficas pode ocasionar a divergência morfológica entre as espécies e a alta plasticidade merística (GARCÍA *et al.*, 2014).

Quando férteis, os híbridos podem promover alterações genéticas nos estoques naturais e podem competir de várias maneiras com as linhagens parentais nativas (HASHIMOTO *et al.*, 2011), mas por outro lado, podem gerar diversidade de indivíduos misturados com novas variações genéticas (aumentando o potencial adaptativo PRADO *et al.*, 2011). Em muitos casos a identificação híbrida baseada em morfologia, ecologia e comportamento pode ser difícil e, na maioria das vezes, confusa e incerta.

3. OBJETIVOS E METAS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar geneticamente populações de peixe-rei, de duas lagoas, através de análises genéticas de polimorfismo de seis marcadores microssatélites, para subsidiar o desenvolvimento de estratégias regionais e políticas para a conservação e manejo da fauna aquática.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a frequência alélica dos *loci* microssatélites definidos para obtenção da diversidade e estrutura da população;
- Analisar a diferenciação alélica e genotípica e desvio do equilíbrio de Hardy Weinberg;
- Realizar análise estatística dos parâmetros genéticos populacionais que definem a estrutura de população.

3.3. Metas

- Determinar a diversidade populacional da espécie alvo.
- Contribuir com a sustentabilidade da pesca artesanal da região

4. PROJETO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Diversidade genética de populações nativas de peixe-rei (*Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*) através de marcadores microssatélites

Equipe:

Prof. Dr. Heden Luiz Marques Moreira (Orientador)

Prof. Dr. Rafael Aldrighi Tavares (Coorientador)

Prof. Dr. Juvêncio Luís Osório Fernandes Pouey

Doutoranda Suzane Fonseca Freitas

Mestranda Fernanda Brunner Hammes

Graduando Paulo Leonardo Oliveira

Graduando Rodrigo Ribeiro Oliveira

Daiane Machado Souza

Pelotas, 2016

1. Caracterização do Problema

Diversas populações ao redor do mundo dependem da pesca em diferentes níveis, seja como fonte de emprego na indústria pesqueira ou mesmo praticando-a como forma de subsistência. O extrativismo pode ser considerado uma lente pela qual se pode observar a estreita relação entre o homem e os recursos hídricos. Esta relação tem sido de certa forma realizada em meio a incertezas visto que variáveis ambientais, incluindo as alterações causadas pelas atividades antrópicas, são determinantes para sustentabilidade em longo prazo da pesca (HILSDORF *et al.*, 2006).

Segundo Smith (1999), a pesca pode ser classificada em cinco categorias: tradicional de subsistência, recreacional, artesanal, industrial e captura em estoques introduzidos por programas de repovoamento. Os recursos pesqueiros em águas interiores são geralmente explorados por comunidades que vivem ao longo de rios, lagos e reservatórios. Em muitos casos, tais comunidades fazem da pesca sua única fonte de renda, sendo o pescado a base de sua alimentação.

Apesar da diversidade de peixes e da sua grande importância econômica para o homem, ainda pouco se conhece sobre suas características biológicas, ecológicas e genéticas (RESENDE *et al.*, 2006). A falta de conhecimento das espécies e consequentemente a falta de manejo destas, além das altas taxas de pesca são os principais responsáveis da perda de diversidade e reduções drásticas nas populações (NASCIMENTO *et al.*, 2001; ALBUQUERQUE *et al.*, 2002; PETRERE *et al.*, 2004). Por isso torna-se necessário conhecer a fundo nossa biodiversidade, especialmente quando se trata de espécies nativas, e espécies que possuem um grande potencial econômico.

A percepção de que a sobre-pesca, de alguma forma vem afetando a disponibilidade dos estoques de peixes, tem sido um consenso entre os cientistas pesqueiros. Esta realidade, verificada nas estatísticas pesqueiras, parece estar relacionada à seletividade das redes de captura que retiram os animais maiores. Conover; Munch (2002) constataram que a retirada constante de animais maiores ao longo do tempo afeta a composição genética do estoque, eliminando os genes relacionados ao crescimento rápido e diminuindo o tamanho médio dos indivíduos remanescentes, esta observação sugere que este fenômeno pode estar ocorrendo com alguns estoques de peixes de interesse comercial. Esses estudos são de grande

importância no que diz respeito a elaboração de projetos visando a conservação de recursos naturais, em especial ao papel desempenhado pelas variações ao nível do genoma em resposta às mudanças ambientais e de sobre-pesca.

Os marcadores microssatélites se mostram uma ferramenta eficiente para monitorar uma população geneticamente (MELO *et al.*, 2006). E a partir das novas tecnologias de sequenciamento, os marcadores microssatélites são obtidos em maior escala, em menos tempo e com os custos bem a baixo comparados com as tecnologias tradicionais para a criação de bibliotecas (CASTOE *et al.*, 2012). Os microssatélites, também conhecidos como STR – (Repetições curtas em tandem “Short tandem Repeats”) ou SSR – (Simple sequências repetidas “Simple repeated sequences”), são elementos repetitivos, arranjadas em repetições em tandem, com o comprimento de dois a seis nucleotídeos e estão entre os *loci* mais polimórficos do genoma. Sendo ferramentas importantes para estudos sobre ecologia, evolução, melhoramento genético e genética de populações (MELO *et al.*, 2006; TAVARES, *et al.*, 2011; CASTOE *et al.*, 2012).

O peixe-rei é um representante da ordem atheriniformes que inclui peixes encontrados em águas doces, marinhas, tropicais e temperadas. Dentro dos atheriniformes é um exemplar da subfamília atherinopsinae, que são compostos por seis gêneros em dois grupos antitropicais: Atherinopsini na América do Norte (Atherinops, Atherinopsis, Colpichtys, Leuresthes) e Sorgentinini na América do Sul (Basilichthys, Odontesthes) (BEMVENUTI, 2002).

No Brasil está presente principalmente nas lagoas Mirim e Mangueira, onde já foram descritas várias espécies como *Odontesthes bonariensis*, *O. humensis*, *O. mirinensis*, sendo as *O. bonariensis* e *O. humensis* mais comumente encontradas (PIEDRAS; POUHEY, 2004; DYER, 2006). A elevada qualidade do peixe-rei, boa aceitação comercial, carne com sabor, cheiro, textura e características químicas semelhantes às das requintadas espécies marinhas (SOMOZA *et al.*, 2008), também tem incentivado o cultivo em locais distantes da sua área de distribuição nativa, como o Japão e a Itália (BAIGÚN *et al.*, 2009).

Os resultados que serão gerados neste estudo, irão contribuir para uma melhor elucidação a respeito da estruturação genético-populacional da espécie, e assim gerar subsídios para o desenvolvimento de projetos de conservação e manejo, além de auxiliar na administração e legislação de pesca, pois levam a geração de critérios de manejo das unidades de estoques que visam a conservação em longo prazo dos

recursos pesqueiros naturais. Este trabalho tem como hipótese que as populações de peixe-rei são diferentes entre as lagoas em estudo.

2. Objetivos e Metas

1.1 Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente populações de peixe-rei, de duas lagoas, através de análises genéticas de polimorfismo de 6 marcadores microssatélites, para subsidiar o desenvolvimento de estratégias regionais e políticas para a conservação e manejo da fauna aquática.

1.2 Objetivos Específicos

- Analisar a frequência alélica dos *loci* microssatélites definidos para obtenção da diversidade e estrutura da população;
- Analisar a diferenciação alélica e genotípica e desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- Realizar análise estatística dos parâmetros genéticos populacionais que definem a estrutura de população.

2.3 Metas

- Determinar a diversidade populacional da espécie alvo.
- Contribuir com a sustentabilidade da pesca artesanal da região.

3. Metodologia

Os peixes serão coletados por pescadores artesanais, licenciados pelo IBAMA, que atuam na Lagoa Mangueira e na Lagoa Mirim, localizadas no município de Santa Vitória do Palmar, RS cidade que faz fronteira com o Uruguai. Serão amostrados 40 peixes de cada lagoa, totalizando 80 peixes, sendo, 20 exemplares da espécie *Odontesthes humensis* e 20 exemplares da espécie *Odontesthes bonariensis* de cada lagoa. O material biológico coletado para análise genética consiste em uma amostra de músculo e nadadeira caudal (aproximadamente 200–300mg), serão armazenados em etanol 95% e preservados a -20°C. Após a coleta, o DNA genômico total será extraído usando separação orgânica pelo protocolo de Cloreto de Sódio (LOPERA-BARRERO *et al.*, 2008), que consiste em maceração do tecido muscular, objetivando a ruptura da parede e membranas celulares, promovendo assim a liberação da molécula de DNA; adição de 600 µL de solução tampão TNE1 (5 ml de tris HCl 1 Molar, pH 8,0, 10 ml de EDTA, 1ml de NaCl, 84 ml de água Milli-Q), tendo por finalidade promover a lise das células, porém preservando sua estrutura, acidez e osmolaridade; adição de 330 µL de TNE2 (5ml tris HCl 1 Molar pH 8,0; 10 ml EDTA, 1ml NaCl; 10 ml SDS 20%), como solução detergente para solubilização das membranas e auxiliando na inativação de enzimas; 4 µL de proteinase K para a desnaturação proteica e incubação imediata à 50°C por 12 horas. Após a incubação, para precipitação de proteínas e restos celulares serão adicionados 340 µL de NaCl 5M; o material será centrifugado a 12000 rpm e transferido o sobrenadante para novos microtubos, onde serão acrescidos 900µL de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA. Posteriormente, será realizada a lavagem do material com 200 µL de etanol 70%. A fase líquida é então cuidadosamente desprezada e as amostras serão secas em estufa a 40°C. Por fim, o DNA será ressuscitado com 100 µL de tampão TE buffer (10 mM de Tris ph 8.0 e 1 mM de EDTA).

Para checagem da integridade do DNA obtido, as amostras serão submetidas a eletroforese horizontal com gel de agarose 1% e tampão TBE1X durante 20 minutos a 80 volts. Para tal, será usada uma alíquota de 7 µL de DNA sendo o mesmo corado com 3 µL de Blue Green Loading DyeTM (LGC Biotecnologia, São Paulo-BR) e 5 µL de DNA Ladder 100pb (Ludwig Biotec) posteriormente visualizados em transiluminador. Os marcadores microssatélites serão amplificados através da técnica de reação de PCR, cujo o volume final será 25µL, contendo 1µL de DNA genômico,

0,5µL de cada primer (10pmol), 2,5µL de 1X buffer de PCR(10mM Tris HCl, 1,5mM MgCl₂ e 50mM KCl), 1,5µL MgCl₂ (25mM), 0,5µL de dNTP(100µM), 0,2µL de Taq DNA polimerase® (Fermentas Life Sciences) e 18,3µL de água livre de nuclease. O controle negativo (reação sem a presença de DNA) será utilizado em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação. As reações serão realizadas em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient® (Eppendorf), cuja amplificação consistirá em: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento conforme a temperatura específica de cada primer por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, terminando com uma extensão final de 8 minutos a 72°C. Serão realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida a 8%, corados pelo método do nitrato de prata e fotografados com câmera digital. Para análise semiautomática das bandas observadas nos géis, será utilizado o programa Image Master - Totallab4 versão 1.0. Os alelos dos loci serão discriminados através de observação direta no gel, baseando-se na presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo locus). A diversidade genética dentro das populações estudadas será caracterizada pelas frequências alélicas, heterozigosidade observada, diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, número de alelos por locus, porcentagem de *loci* polimórficos e índice de fixação de Wright, estimativas obtidas pelo uso do programa Genepop 4.0.

4. Resultados e Impactos esperados

O presente trabalho pretende contribuir na produção de conhecimento que auxilie no estudo da espécie em alvo, geneticamente, em busca de uma população com uma grande diversidade, o que se mostra essencial para manejo dos recursos pesqueiros e conservação da espécie. Outro aspecto importante será preservar a espécie em estudo, que tem grande importância econômica e no ecossistema.

5. Cronograma do Projeto

Item	Atividades	2016	2017	2018	2019	2020
1	Revisão bibliográfica	X	X	X	X	
2	Início do experimento		X			
3	Coleta do material		X			
4	Extração DNA		X	X		
5	Eletroforese			X	X	
6	PCR				X	
7	Tabulações dos dados				X	
8	Análise dos dados				X	
9	Elaboração da Tese				X	
10	Defesa da Tese					X

6. Aspectos Éticos (quando aplicável)

Não se aplica. Os exemplares serão comprados dos pescadores artesanais.

Referências

- ALBUQUERQUE, S.P.; CAMPOS, F.L.R.; CATELLA, A.C. 2002. Sistema de Controle da Pesca de Mato Grosso do Sul SCPECA/MS – 9. Boletim 31 de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Pantanal, Corumbá, n.31, p.47. 57p.
- BAIGÚN, C. R. M.; COLAUTTI, D. C.; GROSMAN, F. Assessment of condition in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes: Atherinopsidae) populations: which index works best? *Neotropical Ichthyology*, Porto Alegre, v. 7, n. 3, p. 439-446, 2009.
- CASTOE, T.A. et al. Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLoS ONE*, v.7, n.2, 2012.
- CONOVER, D.O.; MUNCH, S.B. Sustaining fisheries yields over evolutionary time scales. *Science*, v.297, p. 94-96, 2002.
- DYER, B.S. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). *Biocell*, v.30, n.1, p.69-88, 2006.
- 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, 43p.
- LOPERA-BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES T.S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e Investigacion Agraria*, v.35, n. 1, p. 65-74, 2008.
- MELO, D.C. et al. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.1, p.87-93, 2006.
- NASCIMENTO, F.L.; CATELLA, A.C.; MORAES, A.S. 2001. Distribuição Espacial do Tucunaré, *Cichla* sp. (Pisces, Cichlidae), peixe amazônico introduzido no Pantanal, Brasil. Boletim 24 de Pesquisa e Desenvolvimento. Corumbá: Embrapa Pantanal, n.24, 15p.
- PETREIRE JR., M.; BARTHEM, R.B.; CÓRDOBA, E.A.; GÓMEZ, B.C. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). In: HART, P. J. B.; PICHER, T. J. (eds.). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.14, p.403-414. 2004.
- PIEDRAS, S.R.N.; POUHEY, J.L.O.F. Alimentação de alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) com dietas naturais e artificiais. *Ciência Rural*, v.34, n.4, p.1203-1206, 2004.
- RESENDE, E. K.; HILSDORF, A. W. S.; MARQUES, D. K. S. 2006. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Embrapa Pantanal. Corumbá, MS. 43p.

SOMOZA, G.M.; MIRANDA, L. A.; BERASAIN, G.E.; COLAUTTI, D.; LENICOV M.R.; STRÜSSMANN, C. A. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. *Aquaculture Research*, v. 39, p. 784-793, 2008.

SMITH, P.J. Genetic resources and fisheries: policy aspects. In: PULLIN, R.S.V.; BARTLEY, D.M.; KOOIMAN, J. (eds.). *Towards Policies For Conservation and Sustainable Use of Aquatic Genetic Resources*, ICLARM Conf. Proc. 59, p. 43-62. 1999.

TAVARES, R.A. Estudo genético de duas populações de *Odontesthes bonariensis* através de marcadores microssatélites. 2010. 70f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Zootecnia /Melhoramento Animal). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas-RS. 2011.

5. ARTIGO 1

Diversidade genética de populações naturais de *Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*

Resumo

A diversidade genética é moldada por diversos fatores tanto ambientais como antrópicos e estudar essas mudanças traz o entendimento da história evolutiva da espécie. O peixe-rei é um peixe neotropical com grande importância comercial e principalmente para a biodiversidade da costa da América do Sul, porém são poucos os estudos acerca da diversidade genética desta espécie em ambiente natural. Com a crescente sobrepesca, se torna cada vez mais necessária a elaboração de projetos visando a conservação de recursos naturais, evitando-se desta maneira a perda de variabilidade genética destas populações em decorrência do esgotamento de recursos pesqueiros. O estudo foi realizado em duas lagoas, Mirim e Mangueira, localizadas no sul do Brasil de onde foram obtidas amostras de *Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*. Foram desenhados seis *loci* microssatélites os quais foram validados e apresentaram alto polimorfismo nas populações. Foram obtidos no total 38 alelos e apenas uma população está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O estudo sugere que tenha ocorrido recentes gargalos, talvez associados a mudanças ambientais e efeito de sobrepesca nas lagoas em estudo, sendo necessária a elaboração de projetos de conservação e manejo da espécie.

Palavras-chave: ambiente natural, conservação, microssatélite, peixe-rei

Abstract

Genetic diversity is shaped by several environmental and anthropic factors, and studying these changes brings an understanding of the species' evolutionary history. The silverside is a neotropical fish with great commercial importance and mainly for the biodiversity of the coast of South America, however there are few studies about the genetic diversity of this species in a natural environment. With the increasing

overfishing, it becomes more and more necessary to develop projects aimed at the conservation of natural resources, thus avoiding the loss of genetic variability of these populations due to the depletion of fishing resources. The study was carried out in two lagoons, Mirim and Mangueira, located in the south of Brazil where samples of *Odontesthes humensis* and *Odontesthes bonariensis* were obtained. Six microsatellite loci were designed which were validated and showed high polymorphism in the populations. A total of 38 alleles were obtained and only one population is in Hardy-Weinberg equilibrium. The study suggests that there have been recent bottlenecks, perhaps associated with environmental changes and the effect of overfishing in the ponds under study, requiring the elaboration of conservation and management projects for the species.

Keyword: natural environment. conservation. microsatellite. silverside.

Running Head

Uso de SSR para analisar a diversidade genética do peixe-rei

Introdução

O Brasil é privilegiado por possuir enormes recursos hídricos, seja de água salgada, doce ou salobra, nos quais existe uma grande diversidade de espécies de peixes, alguns já bastante estudados, porém outros, permanecem ainda desconhecidos cientificamente, principalmente com relação a estudos referentes às características genéticas. Neste contexto, existe a necessidade de aprofundar o estudo científico ao nível gênico a fim de verificar a variabilidade genética das populações nativas, pois se sabe que estoques pequenos e isolados podem resultar em consanguinidade e deriva genética, assim como distúrbios antrópicos podem ocasionar perda de diversidade e reduções drásticas nas populações, tornando fundamental a manutenção em nível genético dos estoques naturais (FRANKHAM *et al.*, 2010; ALLENDORF *et al.*, 2012; LOPERA-BARRERO *et al.*, 2016).

O peixe-rei *Odontesthes humensis* (DeBuen, 1953) e *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) são peixes neotropicais ocorrentes em água doce e estuarina na América do Sul. Conhecido comercialmente, o gênero *Odontesthes* possui excelente valor de mercado por suas características físicas e organolépticas, sendo comumente utilizado na pesca esportiva assim como é bastante explorado na pesca

comercial, além de ser modelo experimental para o estudo da determinação sexual e endocrinologia em peixes (SOMOZA *et al.*, 2008; INAZAWA *et al.*, 2011; FERNANDINO *et al.*, 2015; RUEDA *et al.*, 2016), porém são poucos os estudos acerca da diversidade genética desta espécie em ambiente natural. Com a crescente sobrepesca, se torna cada vez mais necessária a elaboração de projetos visando a conservação de recursos naturais, evitando-se desta maneira a perda de variabilidade genética destas populações em decorrência do esgotamento de recursos pesqueiros.

Para isso, os marcadores moleculares são amplamente utilizados em estudos de genética de populações, o que os tornam ferramentas essenciais para o estudo de conservação da diversidade e da estrutura genética de populações de peixes nativos e gerenciamento de pesca (ABDUL-MUNEER, 2014). E a partir das novas tecnologias de sequenciamento, os marcadores microssatélites são obtidos em maior escala, em menos tempo e com os custos bem abaixo quando comparados com as tecnologias tradicionais para a criação de bibliotecas. Os microssatélites, também conhecidos como STR – (Repetições curtas em tandem “*Short tandem Reapeats*”) ou SSR – (Simples sequências repetidas “*Simple sequence repeat*”), são elementos repetitivos, arranjadas em repetições em tandem, denominados di, tri, tetra e penta nucleotídeos e são *loci* altamente polimórficos, caracterizados por apresentarem elevada taxa de mutação (GROVER; SHARMA, 2016; VIEIRA *et al.*, 2016).

Os resultados que serão obtidos neste estudo irão contribuir para uma melhor elucidação a respeito da estruturação genético-populacional da espécie, e assim gerar subsídios para o desenvolvimento de projetos de conservação e manejo, além de auxiliar na administração e legislação de pesca, pois levam a criação de critérios de manejo das unidades de estoques que visam a conservação em longo prazo dos recursos pesqueiros naturais.

Materiais e métodos

Locais de amostragem. O material biológico coletado para análise genética consistiu em uma amostra da nadadeira caudal (aproximadamente 200mg), as quais foram armazenadas em etanol 70% e preservadas a -20°C até o início das análises, este material foi cedido por pescadores artesanais, durante as capturas de pesca nas lagoas Mirim e Mangueira, RS. Após a coleta, o DNA genômico total foi extraído

usando separação orgânica pelo protocolo de Cloreto de Sódio (LOPERA-BARRERO *et al.*, 2008).

Para a análise de variabilidade genética das espécies, os *primers* desenhados para este estudo foram selecionados a partir dos resultados obtidos por Tavares *et al.* (2014) que detectaram, através da biblioteca genômica de *O. humensis*, os “Best PALs” (bPALs) que são *loci* SSRs que apresentam unidades longas de repetições (4mers, 5mers e 6mers) nas populações de *O. humensis*, sendo que no referido estudo foram gerados o total de 167 bPAL.

O desenho dos primers foi realizado com o auxílio do programa Primer3, sendo estabelecido que os primers deveriam apresentar um tamanho entre 20 e 30 pares de bases, temperatura de anelamento entre 50°C e 60°C com diferença de no máximo 3°C e concentração de guanina e citosina entre 40% e 60%

A partir da análise desta biblioteca, foram desenhados seis *loci* tetranucleotídeos (Tabela 1), para serem validados em representantes de duas populações de peixe-rei. Foram utilizados 80 exemplares: 40 animais da espécie *O. bonariensis* e 40 *O. humensis*, sendo 20 animais de cada lagoa (lagoa Mirim latitude 33°12'20.63"S; longitude 53°34'10.89"O e lagoa Mangueira latitude 33° 6'0.75"S; longitude 52°43'56.96"O, Santa Vitória do Palmar, Brasil).

Os seis *loci* selecionados foram sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT) e após foram validados pela técnica de amplificação de PCR. Foi confirmada a sequência microssatélite através de sequenciamento da região *motif* pela empresa MACROGEN. Cada reação de PCR continha 1µL de DNA genômico, 0.5µL de cada primer (10pmol), 2.5µL de 10X buffer de PCR, 1.5µL MgSO₄/MgCL₂, 0.5µL de dNTP, 0.2µL de Taq DNA polimerase® (Ludwig Biotec) e 18.3µL de água livre de nuclease, totalizando um volume final de 25µL. O controle negativo foi feito sem a presença de DNA genômico, para confirmar a ausência de contaminação.

As reações foram realizadas em um termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*® (Eppendorf). A amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento conforme a temperatura específica de cada primer (Tabela 1) por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, terminando com uma extensão final de 8 minutos a 72°C.

Tabela 1 - *Loci* microssatélites, sequências e temperaturas de anelamento dos primers e tamanhos dos fragmentos esperados para análise da variabilidade genética de populações de peixe-rei.

<i>Loci</i>	Sequência primers (5'-3')		MOTIF	TE (pb) ¹	Tm ² °C
	FORWARD	REVERSE			
UFPEL_OH1	TGTGAGACAGGTGTGAGC	TTTCCATACAAGCTGTACGC	AATC	298	55.0
UFPEL_OH2	GTGTGTTGAAGTCTTTCAGC	TGTATGAGTTGCCCTTTTGG	ATCT	297	54.0
UFPEL_OH3	GACAGGTTGGACACATTGG	AGTAACAGAGACCCTCATCC	ATCT	287	53.2
UFPEL_OH4	CCTTCATCTAGTCGCTCCC	CAGTCGACTTGAACAGTAGG	ATCT	294	55.0
UFPEL_OH5	CTAAACTTCCTCAGTCCACC	GTCTCTTTGCTCAAGCTGC	ATGG	296	55.0
UFPEL_OH6	CGATGACCACTGGGATAGG	AAGAGAGCAGTGGTGTAAGC	ATGG	302	54.0

¹TE: tamanho esperado, ²Tm = temperatura *melting*.

Após, foi feita a confirmação da amplificação através de eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando 3µL do produto de PCR, 1.1µL de *buffer* de corrida e 1.1µL de *GelRed*. Na sequência, os produtos de PCR foram analisados em transiluminador sob luz UV e registrados por fotodocumentador.

Para análise do polimorfismo foi feita corrida em gel de poliacrilamida composta por 32ml solução tampão TBE 5X, 8ml de poliacrilamida 30%, 400µL de APS 10% e 40µL de TEMED com tampão de corrida TBE 1X. Cada gel foi carregado com dez amostras e dois marcadores de peso molecular 100 pb (Ludwig Biotec) (Fig. 1.).

Foi utilizado para a corrida em gel de poliacrilamida solução tampão TBE 1X e a voltagem constante de 160V por 1h30min resultando em uma miliamperagem de 120mA. A revelação da amplificação dos alelos foi feita em transiluminador sob luz UV e registrados por fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia)

Os alelos foram analisados através de observação direta no gel de poliacrilamida, conforme pesos moleculares. A diversidade genética dentro das populações foi caracterizada pelas frequências alélicas, heterozigosidade observada, diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, número de alelos por *loci*, conteúdo de informação polimórfica (PIC) e índice de fixação de Wright, estimativas obtidas pelo uso do programa Cervus 3.0.7. e Genepop 4.2.

Resultados

Foram obtidos no total 37 alelos nas populações observadas, sendo este valor considerado alto polimorfismo, conforme exemplificado na figura 1. Os *loci*

UFPEL_OH5 e UFPEL_OH6 foram os menos polimórficos apresentando seis alelos e o *locus* UFPEL_OH3 o mais polimórfico com 14 alelos. Em relação a ocorrência de heterozigotos, o *locus* UFPEL_OH2 apresentou maior presença na espécie *O. humensis* na lagoa Mirim, já na lagoa Mangueira o *locus* UFPEL_OH3 detectou a maior ocorrência de heterozigotos para a mesma espécie. O *locus* UFPEL_OH5 não detectou a presença de indivíduos heterozigotos para nenhuma das duas espécies nos dois locais amostrados. Para a espécie *O. bonariensis* o *locus* UFPEL_OH2 detectou maior presença de heterozigotos nas duas lagoas, seguido pelo *locus* UFPEL_OH3 (lagoa Mirim) e UFPEL_OH4 (lagoa Mangueira) (Tab. 2).

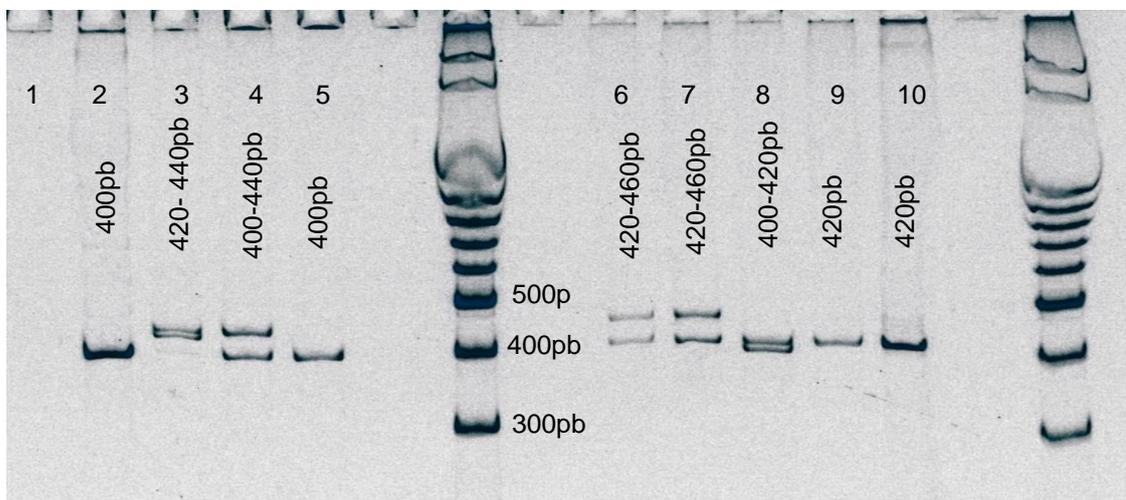


Figura 1 - Perfil eletroforético registrado sob luz UV em fotodocumentador, em gel de poli-acrilamida 12% evidenciando o polimorfismo do *locus* UFPEL_OH4, conforme peso molecular.

Referente ao número de alelos por lagoa, o *locus* UFPEL_OH1 apresentou 6 alelos para cada espécie. O *locus* UFPEL_OH3 apresentou o mesmo número de alelos nas duas lagoas, sendo 7 alelos para a espécie *O. bonariensis* e 3 alelos para a espécie *O. humensis*. Os *loci* UFPEL_OH2, UFPEL_OH4 e UFPEL_OH5 mostraram maior número de alelos na lagoa Mirim e o *locus* UFPEL_OH6 para a lagoa Mangueira. (Tabela 2). Os valores de frequência alélica mais expressivos nas populações podem ser observados na tabela 3.

Tabela 2 - Variação alélica do peixe-rei nas lagoas Mirim e Mangueira, Brasil.

<i>Odontesthes humensis</i>										
<i>Loci</i>	Nº de alelos ¹		T. dos alelos (pb) ²		Amplificações		LMI ³		LMA ⁴	
	LMI ³	LMA ⁴	LMI ³	LMA ⁴	LMI ³	LMA ⁴	Het ⁵	Homo ⁶	Het ⁵	Homo ⁶
UFPEL_OH1	6	6	172-212	172-220	20	18	7	13	3	15
UFPEL_OH2	8	6	252-352	252-340	16	17	10	6	6	11
UFPEL_OH3	3	3	192-212	220	20	19	10	9	14	5
UFPEL_OH4	9	5	400-500	400-472	19	17	9	10	10	7
UFPEL_OH5	5	2	200-224	212-220	17	18	0	17	0	18
UFPEL_OH6	5	5	224-260	224-260	20	19	0	20	1	18

<i>Odontesthes bonariensis</i>										
<i>Loci</i>	Nº de alelos ¹		T. dos alelos (pb) ²		Amplificações		LMI ³		LMA ⁴	
	LMI ³	LMA ⁴	LMI ³	LMA ⁴	LMI ³	LMA ⁴	Het ⁵	Homo ⁶	Het ⁵	Homo ⁶
UFPEL_OH1	6	6	164-212	160-220	17	19	8	9	7	12
UFPEL_OH2	6	7	240-292	240-300	18	18	16	2	14	4
UFPEL_OH3	7	7	392-460	380-492	17	16	10	7	8	8
UFPEL_OH4	4	7	480-512	400-520	17	19	4	13	11	8
UFPEL_OH5	3	2	212-240	212-224	17	9	0	17	0	9
UFPEL_OH6	2	3	224-252	220-252	18	19	0	18	0	19

¹Número de alelos; ²Tamanho dos alelos; ³Lagoa Mirim; ⁴Lagoa Mangueira; ⁵Heterozigoto; ⁶Homozigoto

Tabela 3 - Frequência alélica de *O. bonariensis* e *O. humensis* em dois locais de estudo.

<i>Locus</i>	Lagoa Mirim				Lagoa Mangueira			
	<i>O. bonariensis</i>		<i>O. humensis</i>		<i>O. bonariensis</i>		<i>O. humensis</i>	
	Alelo	Freq.*	Alelo	Freq.*	Alelo	Freq.*	Alelo	Freq.*
UFPEL_OH1	200	0.3529	200	0.3421	200	0.3250	200	0.4722
UFPEL_OH2	252	0.3333	272	0.2778	252/260	0.3438	272	0.5882
UFPEL_OH3	400	0.4412	200	0.1875	400/420/440/452	0.5000	212	0.4737
UFPEL_OH4	500	0.7647	460	0.3684	480	0.2105	452	0.3529
UFPEL_OH5	252	0.7647	252	0.6667	252	0.2941	220	0.6667
UFPEL_OH6	252	0.8333	252	0.8421	252	0.4500	224	0.3158

*Frequência alélica: maior frequência alélica observada nas populações.

A heterozigosidade observada em relação a heterozigosidade esperada foi inferior, sugerindo a existência de endogamia populacional, com exceção apenas para a espécie *O. bonariensis* que apresentou resultado inverso referente aos dois locais

de amostragem. O valor de PIC foi superior a 0.5 em todas as populações, exceto na espécie *O. bonariensis* referente aos *loci* UFPEL_OH5 e UFPEL_OH6. Os valores de FIS e FIT variaram de acordo com a maior presença ou ausência de heterozigotos (Tab. 4).

Tabela 4 - Análise da variação genética de *O. humensis* e *O. bonariensis* em dois locais de amostragem, lagoa Mirim e lagoa Mangueira, Brasil.

<i>Loci</i>		LMI ¹	LMA ²	<i>O. humensis</i> (LMI ¹ *LMA ²)	<i>O. bonariensis</i> (LMI ¹ *LMA ²)
UFPEL_OH1	Hesp ³	0.803	0.775	0.764	0.787
	Hob ⁴	0.405	0.270	0.263	0.417
	PIC ⁵	0.765	0.738	0.721	0.744
	FIS ⁶	0.4822	0.6496	0.6564	0.4719
	FST ⁷	0.0610	0.0269	0.0112	0.0075
	FIT ⁸	0.5138	0.6590	0.6602	0.4759
	HWE ⁹	0.00000	0.00000	0.00000	0.00002
UFPEL_OH2	Hesp ³	0.827	0.783	0.738	0.785
	Hob ⁴	0.765	0.571	0.485	0.833
	PIC ⁵	0.790	0.742	0.703	0.740
	FIS ⁶	0.0401	0.2134	0.3356	-0.0548
	FST ⁷	0.0721	0.1378	0.0327	-0.0147
	FIT ⁸	0.1093	0.3218	0.3573	-0.0704
	HWE ⁹	0.00163	0.01628	0.00000	0.50781
UFPEL_OH3	Hesp ³	0.848	0.866	0.666	0.837
	Hob ⁴	0.556	0.629	0.632	0.545
	PIC ⁵	0.817	0.838	0.593	0.805
	FIS ⁶	0.2070	0.1541	0.0137	0.3315
	FST ⁷	0.2971	0.2502	0.0744	0.0580
	FIT ⁸	0.4426	0.3657	0.0871	0.3703
	HWE ⁹	0.00000	0.00000	0.00673	0.00015
UFPEL_OH4	Hesp ³	0.781	0.885	0.884	0.698
	Hob ⁴	0.361	0.556	0.500	0.417
	PIC ⁵	0.751	0.860	0.859	0.640
	FIS ⁶	0.4600	0.2879	0.4128	0.3026
	FST ⁷	0.2557	0.2155	0.0805	0.2545
	FIT ⁸	0.5981	0.4414	0.4600	0.4801
	HWE ⁹	0.00000	0.00000	0.00000	0.00172
UFPEL_OH5	Hesp ³	0.674	0.604	0.752	0.449
	Hob ⁴	0.000	0.000	0.000	0.000
	PIC ⁵	0.631	0.527	0.703	0.414
	FIS ⁶	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	FST ⁷	0.1736	0.3793	0.2688	0.0768
	FIT ⁸	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	HWE ⁹	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
UFPEL_OH6	Hesp ³	0.581	0.673	0.780	0.283
	Hob ⁴	0.000	0.026	0.026	0.000
	PIC ⁵	0.551	0.629	0.733	0.252
	FIS ⁶	1.0000	0.9516	0.9670	1.0000
	FST ⁷	0.1746	0.3299	0.0325	-0.0447
	FIT ⁸	1.0000	0.9676	0.9680	1.0000
	HWE ⁹	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

¹LMI: lagoa Mirim; ²LMA: lagoa Mangueira; ³Hesp: heterozigosidade esperada; ⁴Hob: heterozigosidade observada; ⁵PIC: conteúdo informativo de polimorfismo; ⁶FIS: coeficiente de endogamia; ⁷FST:

proporção de variância das frequências alélicas; ⁸FIT: índice de fixação para a população; ⁹HWE: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Discussão

O índice FIS afere a endogamia dos indivíduos em relação às suas subpopulações. Logo, os resultados positivos sugerem um déficit de heterozigotos, principalmente nos *loci* UFPEL_OH5 e UFPEL_OH6 que obtiveram resultado igual a 1. Todavia esta característica não parece estar associada a perda alélica, mas sim a ocorrência de endogamia ou efeito *Wahlund* nas populações referidas. Somente o *locus* UFPEL_OH2 para a espécie *O. bonariensis* apresenta-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, nas demais populações a hipótese nula de equilíbrio foi aceita. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) refere-se ao poder informativo do marcador, ao qual valores superiores a 0.5 são considerados altamente informativos. A capacidade de detecção dos SSR sob estudo é evidenciada pelo alto polimorfismo observado nos seis *loci* microssatélites (38 alelos).

O número de alelos que neste estudo variou de 2 a 9 por espécie, totalizando 38 alelos com a utilização de seis *loci* nas populações, sendo semelhante ao encontrado por Beheregaray; Sunnucks (2000) que utilizaram doze *loci* microssatélite nas espécies *O. argentinensis* e *O. perugiae* e encontraram de 6 a 33 alelos nas populações e menor que o encontrado por Tavares *et al.* (2011) que encontraram 49 alelos em populações de *O. bonariensis*.

O valor de FST, que mede a proporção de diferenciação das frequências alélicas entre as duas espécies na mesma lagoa e intra espécie em lagoas diferentes foi considerado baixo para os *loci* UFPEL_OH1, UFPEL_OH2 e UFPEL_OH6, exceto entre as duas espécies na lagoa Mirim no *locus* UFPEL_OH1, o qual foi considerado diferenciação mediana. Os *loci* UFPEL_OH5 e UFPEL_OH6 apresentaram muito grande diferenciação genética entre as espécies dentro da lagoa Mangueira e grande diferenciação dentro da lagoa Mirim. Quando observado intra espécie nas duas lagoas, o *locus* UFPEL_OH4 apresentou diferenciação muito grande na espécie *O. bonariensis*, o que igualmente aconteceu com o *locus* UFPEL_OH5 na espécie *O. humensis* indicando que houve deriva genética.

A heterozigosidade esperada e a heterozigosidade observada foram bastante variáveis entre os *loci*. No *locus* UFPEL_OH1 ocorreu a predominância de indivíduos

homozigotos, nos *loci* UFPEL_OH4, UFPEL_OH5 e UFPEL_OH6 a população amostrada é endogâmica, o que corrobora com os resultados de FIS encontrados para estes *loci*, sugerindo que as populações sofreram redução de diversidade genética em função da pressão de pesca, além da seleção natural e da mutação que também podem ter efeitos importantes sobre a diversidade genética (Wang *et al.*, 2012). O *locus* UFPEL_OH2 na espécie *O. bonariensis*, nas duas lagoas, apresentou predominância de indivíduos heterozigotos, o valor negativo de FIS corrobora com essa afirmativa. Semelhante ao resultado para o *locus* UFPEL_OH3 que teve predominância de heterozigotos na espécie *O. humensis*, nas duas lagoas.

García *et al.* (2014), em estudo com cinco espécies de *Odontesthes*, sugerem que tenha ocorrido recentes gargalos mais ou menos dramáticos e episódios de efeito fundador de reduções populacionais, talvez associados a mudanças nos ambientes dos lagos e lagoas pampeanos de água doce do continente desde o Pleistoceno, o que pode estar acontecendo nas lagoas em estudo.

Através da estimativa da heterozigosidade esperada, estatísticas-F de Wright e o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg, medidas clássicas de variação genética, foi possível a realização de inferências relevantes acerca da estrutura da variação genética dentro e entre as populações de peixe-rei. Este trabalho reforça a necessidade da implantação de projetos de conservação e manejo, para que se possa garantir a estrutura genético-populacional da referida espécie em seu ambiente natural.

Referências

Abdul-Muneer, PM. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. **Genetics Research International**. [serial on the Internet]. 2014; 2014:1-11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/691759>

Allendorf FW, Luikart GH, Aitken SN, editors. **Conservation and the Genetics of Populations**. Oxford: Wiley Blackwell Publishing; 2012.

Beheregaray LB, Sunnucks P. Microsatellite *loci* isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* species group and their use in other South

American silverside fish. **Molecular Ecology**. [serial on the Internet]. 2000; 9(1): 629-644. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00882.x>

Fernandino JI, Hattori RS, Strüssman CA, Yamamoto Y, Somoza GM. Sex determination in fish: *Odontesthes spp.* (Atherinopsidae) as experimental models. **Animal Reproduction**. [serial on the Internet]. 2015; 12(1):24-27. Available from: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6039f7783717068b4633>

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. **Introduction to conservation genetics**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.

García G, Ríos N, Gutiérrez V, Varela JG, Fernández CB, Pardo BG, Portela PM. Promiscuous Speciation with Gene Flow in Silverside Fish Genus *Odontesthes* (Atheriniformes, Atherinopsidae) from South Western Atlantic Ocean Basins. **Plos One**. [serial on the Internet]. 2014; 9(8): 1-15. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104659>

Grover A, Sharma PC. Development and use of molecular markers: past and presente. **Critical Reviews in Biotechnology**. [serial on the Internet]. 2016; 36(2): 290-302. Available from: <https://dx.doi.org/10.3109/07388551.2014.959891>

Inazawa J, Hattori RS, Oura M, Yokota M, Strüssmann CA. Temperature effects on sex differentiation of the reciprocal hybrids of *Odontesthes bonariensis* and *Odontesthes hatcheri* (Atherinopsidae). **Aquaculture Research**. [serial on the Internet]. 2011; 42:746-753. Available from: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02757>.

Lopera-Barrero NML, Povh JA, Ribeiro RP, Gomes PC, Jacometo CB, Lopes TS. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**. [serial on the Internet]. 2008; 35(1):65-74. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/299079146>

Lopera-Barrero NM, Santos SCA, Goes ESR, Castro PL, Souza FP, Poveda-Parra AR, Casseta J, Pontillo BG, Ribeiro RP. Monitoramento e conservação genética de populações naturais de *Prochilodus lineatus* dos rios Pardo, Mogi-Guaçu e Tietê,

São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. [serial on the Internet]. 2016; 68(6):1621-1628. Available from: <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8791>.

Rueda EC, Mullaney KA, Conte-Grand C, Habit EM, Cussac V, Orti G. Displacement of native Patagonian freshwater silverside populations (*Odontesthes hatcheri*, Atherinopsidae) by introgressive hybridization with introduced *O. bonariensis*.

Biological Invasions. [serial on the Internet]. 2016; 19(3): 971-988. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1295-y>

Somoza GM, Miranda LA, Berasain GE, Colautti D, Mauricio Remes Lenicov MR, Strüssmann CA. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. **Aquaculture Research**. [serial on the Internet]. 2008; 39: 784-793. Available from: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01930.x>

Tavares RA, Nunes MD, Almeida DB, Silva JC, Vaz BS, Moreira CGA, Dionello NJL, Piedras SRN, Moreira HLM. Utilization of microsatellite markers to form families of "pejerrey" *Odontesthes bonariensis* in a genetic breeding program. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. [serial on the Internet]. 2011; 63(5): 1263-1267. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000500034>

Tavares RA, Piedras SRN, Nunes MD, Almeida DB, Moreira CGA, Fernandes JM, Freitas SF, Moreira HLM, Pouey JLOF, Dionello NJL. Identificação de loci microssatélites com potencial de amplificação na espécie de Peixe-Rei (*Odontesthes humensis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. [serial on the Internet]. 2014; 66(6): 1941-1945. Available from: <https://dx.doi.org/10.1590/1678-7444>

Vieira MLC, Santini L, Diniz AL, Munhoz CF. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**. [serial on the Internet]. 2016; 39(3): 312-228. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>

Wang L, Shi X, Su Y, Meng Z, Lin H. Loss of Genetic Diversity in the Cultured Stocks of the Large Yellow Croaker, *Larimichthys crocea*, Revealed by Microsatellites.

International Journal of molecular sciences. [serial on the Internet]. 2012; 13(5): 5584-5597. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms13055584>

ARTIGO 2

***Locus* diagnóstico para identificação de híbridos de peixe-rei (*Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*) em população natural**

Resumo

A hibridação é um fenômeno natural que ocorre mais frequentemente em peixes do que em outros vertebrados. A utilização de marcadores moleculares nucleares e mitocondriais, fornecem resultados valiosos na detecção destes eventos. O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de híbridos interespecíficos em populações naturais de peixe-rei. As amostras de *Odontesthes humensis*, *Odontesthes bonariensis* e de indivíduos que morfologicamente eram diferentes das espécies puras foram coletadas na lagoa Mangueira, localizada no sul do Brasil. Foram sintetizados e testados seis *loci* microssatélites tetranucleotídeos. O *locus* UFPEL_OH3 se mostrou diagnóstico para detecção de híbridos de peixe-rei. O marcador mitocondrial sintetizado a partir de sequências conservadas de *Odontesthes* no banco de dados genético GenBank não demonstrou diferenças na sequência genética das amostras.

Palavras-chave: citocromo b; hibridação; marcador microssatélite; peixe

Abstract

Hybridization is a natural phenomenon that occurs more often in fish than in other vertebrates. The use of nuclear and mitochondrial molecular markers provide valuable results in the detection of these events. The aim of this study was to investigate the occurrence of interspecific hybrids in natural populations of silverside. The samples of *Odontesthes humensis*, *Odontesthes bonariensis* and individuals that were morphologically different from pure species were collected in the Mangueira lagoon, located in southern Brazil. Six tetranucleotide microsatellite loci were synthesized and tested. The UFPEL_OH3 *locus* proved to be diagnostic for the detection of silverside hybrids. The mitochondrial marker synthesized from conserved *Odontesthes*

sequences in the GenBank genetic database showed no differences in the genetic sequence of the samples.

Keywords: cytochrome b. hybridization. microsatellite marker. fish.

Introdução

O cruzamento natural interespecífico ocorre com mais frequência em peixes do que em outros vertebrados (PRADO *et al.*, 2012), e embora exista a suposição de que a hibridação tenha pouca influência na especiação e evolução, os híbridos podem estar envolvidos no surgimento de novas linhagens e no fluxo gênico. A detecção precisa de híbridos usando métodos moleculares depende dos marcadores utilizados e do grau de diferenciação entre espécies parentais (HASSELMAN *et al.*, 2014; PORTO-FORESTI *et al.*, 2013; HASHIMOTO *et al.*, 2013). A hibridação pode, de certa forma, ameaçar a biodiversidade concorrendo de várias maneiras com a linhagem parental nativa (HASHIMOTO *et al.*, 2010; HASHIMOTO *et al.*, 2011), mas por outro lado, pode gerar diversidade aumentando o potencial adaptativo de indivíduos misturados com novas variações genéticas (PRADO, *et al.*, 2011).

De acordo com Abdul-Muneer (2014), para determinar o nível de conservação da diversidade e da estrutura genética de populações naturais, as ferramentas mais utilizadas são os marcadores genéticos, sendo os marcadores microssatélites um dos mais usados na atualidade em estudos de ecologia e evolução, pois eles detectam diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos de uma população e entre populações. Os microssatélites, por se distribuírem por todo o genoma aleatoriamente, apresentam alto grau de polimorfismo e facilidade de detecção, por isso são ideais para o estudo da diversidade genética e evolução de espécies.

Na década de 1990, quando os marcadores microssatélites foram descritos, descobriu-se um poderoso meio para relatar a variação genética em *loci* nucleares. Allendorf (2017), afirma que com os marcadores microssatélites é possível a detecção de gargalos ocorridos no passado, possibilitando assim a estimativa do tamanho efetivo populacional atual a partir de uma única amostra, expondo a riqueza de *loci* que melhoraram acintosamente a capacidade de estimar as características genéticas e populacionais em diferentes espécies, que se constituem em parâmetros importantes para o estabelecimento de estratégias de conservação. Na atualidade, os estudos em genética de populações permitem detectar regiões do genoma que são

afetadas pela seleção natural, como por exemplo características referentes às adaptações ao ambiente, hibridação, depressão demográfica e endogamia, como também por fatores antropogênicos.

Por sua vez, a análise do genoma mitocondrial, isoladamente ou em combinação com outros marcadores nucleares, como microssatélites, é amplamente utilizada em estudos de elucidação da estrutura populacional, pois apresenta herança materna e o repertório de genes codificados é extremamente conservado (AZIZ *et al.*, 2015; SATOH *et al.*, 2016). Marcadores mitocondriais são amplamente utilizados em estudos sobre peixes e um grande número de primers universais está disponível para amplificar diferentes genes do genoma mitocondrial de muitas espécies de peixes, pois parecem não sofrer recombinação e evoluem cerca de dez vezes mais rápido que o genoma nuclear (KOCHZIUS, 2009).

O peixe-rei ou pejerrey, *Odontesthes humensis* (de Buen, 1953) e *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) são pertencentes à ordem Atheriniforme, sendo importantes recursos pesqueiros nas diversas regiões onde se distribuem, tanto na pesca comercial, esportiva ou na aquariofilia. Pode ser encontrado em rios e lagos de água doce, em ambiente marinho como também em estuários, em baixas altitudes até áreas muito altas como no lago Titicaca. Ocorrem em diversos países da América do Sul, como no Brasil, Uruguai, Argentina, Peru e Chile (CAMPANELLA, 2015; ESCHMEYER, 2013; WINGERT, 2017).

Com o objetivo de investigar a ocorrência de híbridos interespecíficos em populações naturais de peixe-rei, foram desenvolvidos conjuntos de primers para amplificação de seis regiões microssatélites a partir da biblioteca genômica de *O. humensis* e também desenhados iniciadores para amplificação de um fragmento do gene mitocondrial citocromo b (*CYTB*) a partir de regiões conservadas de *Odontesthes* sp. contidas no banco de dados GenBank.

Material e métodos

Locais de amostragem. Para melhor avaliação e aproveitamento do material, foram obtidos fragmentos a partir de duas fontes biológicas do mesmo animal: músculo e nadadeira (200-300 mg). As amostras foram fornecidas por pescadores

artesanais no momento do desembarque em pontos distintos da Lagoa Mangueira entre as coordenadas latitude 33° 6'0.75"S e longitude 52°43'56.96"O.

Ao total, foram utilizados 75 exemplares, sendo 20 animais da espécie *O. humensis*, 20 *O. bonariensis* e 35 animais que morfologicamente eram diferentes das espécies puras (fig. 1).

Primeiramente a identificação e diferenciação interespecífica foi feita através de análise morfológica (BEMVENUTI, 2002).



Figura 1 - Peixe-rei. (A) *O. humensis*; (B) híbrido; (C) *O. bonariensis*.

Extração de DNA. A extração do DNA genômico total foi realizada seguindo o protocolo de Cloreto de Sódio proposto por Lopera-Barrero *et al.* (2008), com modificações. Para checagem da integridade do DNA obtido, as amostras foram submetidas a eletroforese horizontal com gel de agarose 1% e tampão SB1X durante 40 minutos a 120 volts. Para tal, foi usada uma alíquota de 7 μ L de DNA sendo o mesmo corado com 1.1 μ L de GelRed (Biotium, USA) e 1.1 μ L de Loading Buffer 5X; bem como Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas Life Science) como referência para estimativação de peso molecular.

Desenho dos primers. Os *primers* microssatélites desenhados para este estudo foram selecionados a partir dos resultados obtidos por Tavares *et al.* (2014) que detectaram, através da biblioteca genômica de *O. humensis*, os “Best PALs” (bPALs) que são *loci* SSRs que apresentam unidades longas de repetições (4mers, 5mers e 6mers) nas populações de *O. humensis*, no referido estudo foram gerados o total de 167 bPAL.

A partir da análise desta biblioteca, foram desenhados conjuntos de primers para amplificação de seis *loci* tetranucleotídeos, os quais foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT) e após foram validados pela técnica de amplificação da PCR em gel de agarose 1%. Os critérios para a escolha dos *primers* foram baseados na presença de motivos SSR unicamente tetranucleotídeo, diferença máxima de temperatura entre os primers de 5°C e o tamanho da sequência *motif* ser de 21 a 25 pb.

CYTB. As sequências mitocondriais do CYTB foram obtidas através de varredura das sequências conservadas de *Odontesthes* sp. a partir do banco de dados GenBank do NCBI. Após alinhamento das sequências do gene, foram analisadas regiões conservadas entre as diferentes espécies de *Odontesthes* para desenho de *primers*. Como critério para escolha das regiões iniciadoras preconizou-se: diferença de primer *forward* e *reverse* inferior a 3°C, conteúdo GC entre 40 e 60%, temperatura de anelamento entre 55 e 65°C bem como iniciadores com tamanho entre 18 e 25 nucleotídeos. O conjunto de *primers* que melhor se adequou aos critérios estabelecidos foi selecionado para síntese pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT), por fim, os *primers* foram validados pela técnica de amplificação da PCR e o amplicon foi sequenciado para confirmação da sequência do gene.

As sequências editadas e o alinhamento foram feitos com o auxílio do programa MEGA (alinhamento ClustalW), com os parâmetros Pairwise alignment e Multiple alignment, e após foi construída árvore filogenética UPGMA com os parâmetros Bootstrap com 10.000 reamostragens, seguindo o modelo MCL.

PCR e Sequenciamento. Para a reação em cadeia da polimerase foi utilizada a enzima Taq DNA polimerase e tampão de reação de 10 × PCR contendo MgCl₂ (Sigma-Aldrich), dNTP 100 Mm (Thermo Scientific) e primers específicos para o peixe-rei. Foram realizados 35 ciclos por PCR, a temperatura de desnaturação inicial utilizada foi de 94°C por 5 minutos, desnaturação final a 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento de acordo com a estabelecida para cada primer por 45 segundos, a fase de extensão foi de 72°C por 45 segundos e a extensão final a 72°C por 8 minutos. O sequenciamento foi realizado seguindo os critérios estabelecidos pela empresa MacroGen. As sequências microssatélite e mitocondrial foram confirmadas através de sequenciamento do amplicon pela empresa MacroGen, a sequência mitocondrial através de alinhamento pelo programa MEGA e utilização da ferramenta BLAST (*Basic Alignment Tool Sequence*) para as sequências mitocondriais.

Poliacrilamida. A genotipagem dos *loci* microssatélites foi realizada por meio de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, composta por 32ml solução tampão SB 1X, 8ml de poliacrilamida 30%, 400 μ L de APS 10% e 40 μ L de TEMED com tampão de corrida SB 1X. Cada gel foi carregado com dois marcadores de peso molecular 100 pb e treze amostras, totalizando capacidade para quinze amostras. Foi utilizado para a corrida em gel de poliacrilamida solução tampão SB 1X e a voltagem constante de 160V por 1h30min resultando em uma miliamperagem de 120mA. A revelação da amplificação dos alelos foi feita em transluminador sob luz UV e registrados por fotodocumentador. Os alelos de foram analisados através de observação direta no gel de poliacrilamida, conforme pesos moleculares.

Resultados

Dentre os primers testados, o *locus* UFPEL_OH3 detectou a presença de híbridos interespecíficos. O *primer* diagnóstico (UFPEL_OH3) amplificou a frequência de banda de 200pb em *O. humensis* e 400pb em *O. bonariensis*, e nos indivíduos híbridos ocorreu padrão heterozigoto de amplificação, 200pb e 400pb no mesmo indivíduo (Fig. 2).

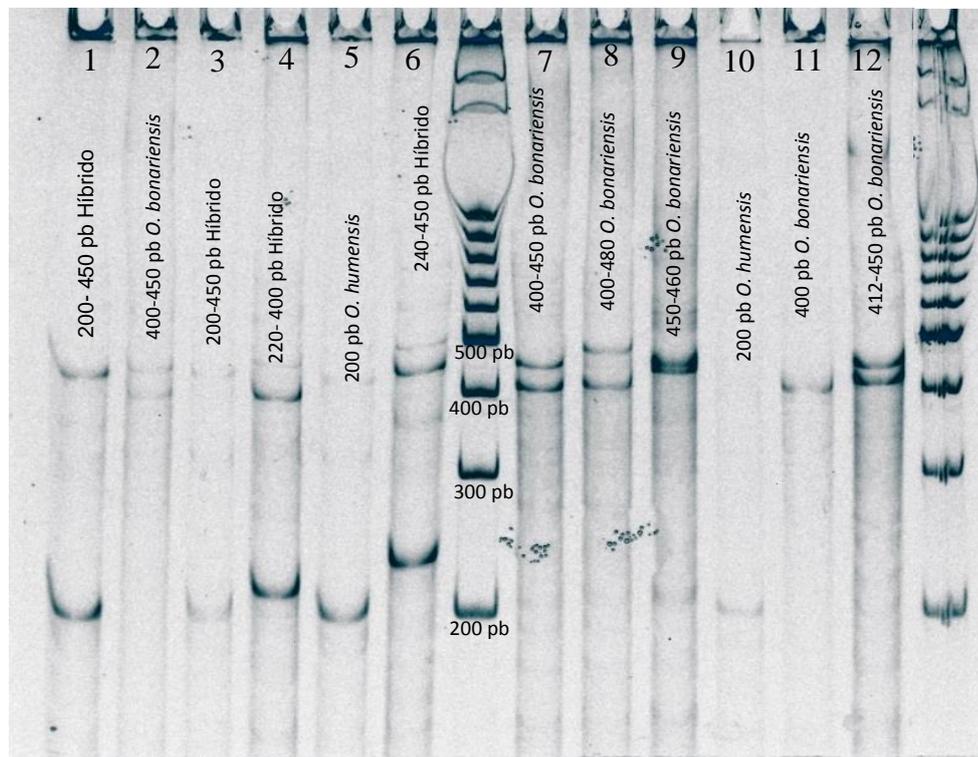


Figura 2 - Perfil eletroforético registrado sob luz UV em fotodocumentador, em gel de poliacrilamida 12%, expondo o polimorfismo do *locus* UFPEL_OH3 em *O. bonariensis*, *O. humensis* e híbridos.

Foi detectado alto polimorfismo em observação no gel de poliacrilamida 12%, que mostrou variação alélica de 21 alelos no primer diagnóstico e 43 alelos referentes aos seis *loci* testados na população em estudo (Tab 1).

Tabela 1 - Sequência dos primers, (Tm²°C) temperatura de anelamento, (N° alelos) número de alelos por *locus*, (Het) número de heterozigotos, (Homo) número de homozigotos.

<i>Loci</i>	Sequência primer 5'-3'	Tm ² °C	N° alelos	Het			Homo		
				HB	BO	HU	HB	BO	HU
UFPEL_OH1	F: TGTGAGACAGGTGTGAGC R: TTTCCATACAAGCTGTACGC	55.0	12	18	7	3	7	12	15
UFPEL_OH2	F: GTGTGTTGAAGTCTTTCAGC R: TGTATGAGTTGCCCTTTTGG	54.0	15	19	14	6	12	4	11
UFPEL_OH3	F: GACAGGTTGGACACATTGG R: AGTAACAGAGACCCTCATCC	53.2	21	20	8	14	10	8	5
UFPEL_OH4	F: CCTTCATCTAGTCGCTCCC R: CAGTCGACTTGAACAGTAGG	55.0	14	12	11	10	20	8	7
UFPEL_OH5	F: CTAAACTTCCTCAGTCCACC R: GTCTCTTTGCTCAAGCTGC	55.0	8	0	0	0	31	9	18
UFPEL_OH6	F: CGATGACCACTGGGATAGG R: AAGAGAGCAGTGGTGTAAAGC	54.0	7	3	0	1	23	19	18

Foram encontrados 236 sítios de conservação para os híbridos, assim como para os exemplares puros coletados e confrontados no estudo, confirmando que a sequência mitocondrial de estudo apresentou 100% de identidade entre as espécies avaliadas. Quando confrontado com as sequências do banco de dados GenBank, o *O. humensis*, *O. ledae*, *O. perugiae* e *O. argentinenses*, respectivamente, foram os que mais se aproximaram geneticamente das amostras em estudo (Tab. 2).

Tabela 2 - Sítios de conservação de sequências mitocondriais das amostras em estudo (*O. humensis*, 1 ao 5; Híbrido, 2 ao 5; *O. bonariensis*, 1 ao 5) confrontada com sequências de *Odontesthes* do banco de dados genético GenBank.

Amostras em estudo	Sítios de conservação	Sequências conservadas GenBank	Sítios de variação
<i>O. humensis</i> 1	236	<i>O. hatcheri</i> (GQ352668.1)	13
<i>O. humensis</i> 2	236	<i>O. bonariensis</i> (GQ352667.1)	51
<i>O. humensis</i> 3	236	<i>O. incisa</i> (GQ352666.1)	51
<i>O. humensis</i> 4	236	<i>O. smitti</i> (GQ352665.1)	51
<i>O. humensis</i> 5	236	<i>O. argentinensis</i> (GQ352664.1)	51
Híbrido 2	236	<i>O. nigricans</i> (KM400719.1)	13
Híbrido 3	236	<i>O. mauleanum</i> (KM400716.1)	11
Híbrido 4	236	<i>O. regia</i> (KM400715.1)	15
Híbrido 5	236	<i>O. gracilis</i> (KM400714.1)	14
<i>O. bonariensis</i> 1	236	<i>O. brevianalis</i> (KM400713.1)	14
<i>O. bonariensis</i> 2	236	<i>O. humensis</i> (KM400712.1)	0
<i>O. bonariensis</i> 3	236	<i>O. perugiae</i> (KM400711.1)	1

<i>O. bonariensis</i> 4	236	<i>O. ledae</i> (KM400710.1)	0
<i>O. bonariensis</i> 5	236	<i>O. argentinensis</i> (KM400708.1)	3

A árvore filogenética (Fig 3) mostra a proximidade genética dos táxons. Pode-se observar que as amostras utilizadas neste estudo estão intimamente ligadas com um ancestral comum, já as amostras preservadas de *Odontesthes* do banco genético GenBank passaram por cladogênese, promovendo distância genética entre as espécies, o que corrobora com os resultados encontrados nos sítios de variação.

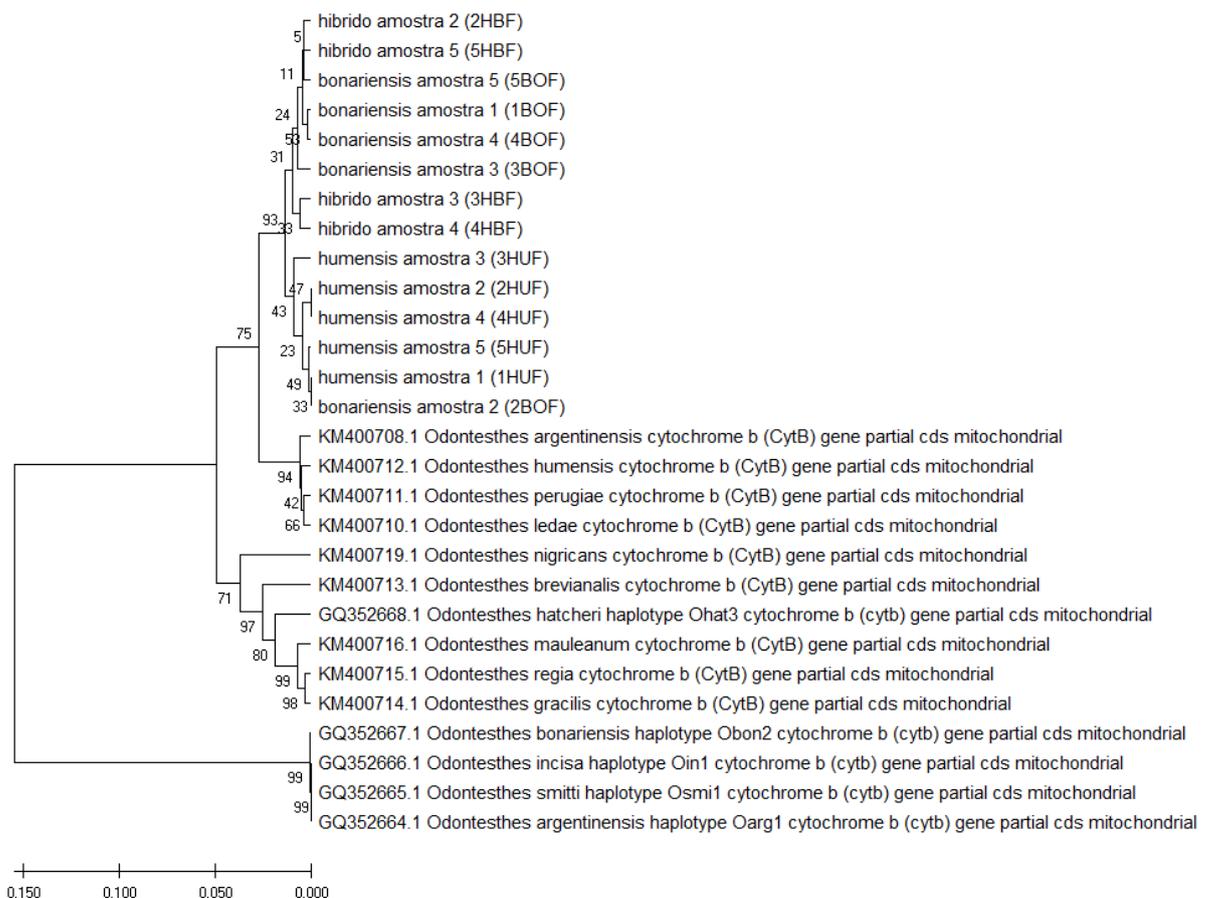


Figura 3 - Árvore filogenética mostrando as distâncias genéticas entre espécies do gênero *Odontesthes* do banco de dados GenBank e de amostras coletadas na Lagoa Mangueira, RS -Brasil.

DISCUSSÃO

A hibridação é um fenômeno natural conhecido há muito tempo por afetar muitas espécies de peixes (RUEDA *et al.*, 2016). A utilização de marcadores moleculares nucleares (microssatélites) e mitocondriais (*CYTB*) fornecem resultados

valiosos na detecção de eventos de hibridação, bem como na identificação de híbridos. A caracterização genética é essencial, pois os híbridos podem apresentar características morfológicas e biológicas diferentes entre si.

Tejedor (2001) relatou a ocorrência de hibridação natural entre os táxons *O. bonariensis* e *O. argentinensis* na Lagoa Grande da Argentina e Rueda *et al.* (2016) confirmaram a ocorrência de híbridos entre *O. bonariensis* e *O. hatcheri* em lagos da Patagônia no Chile e na Argentina. Na região da lagoa em estudo, não existem trabalhos mencionando a ocorrência de híbridos interespecíficos de peixe-rei, assim como não há informações se essas espécies podem resultar em híbridos férteis e na viabilidade de retrocruzamento. Neste sentido, a aplicação de técnicas de genética molecular constitui uma importante ferramenta de identificação dos estoques e das características particulares dessa população e essencial para iniciar qualquer programa de monitoramento para auxiliar a preservação da integridade genética de espécies puras (PORTO-FORESTI *et al.*, 2013).

De acordo com Hasselman *et al.* (2014), distúrbios antropogênicos no habitat são os maiores causadores de hibridação, com o colapso do isolamento reprodutivo entre espécies incipientes que recentemente divergiram na simpatria ou introgressão entre espécies alopátricas, O estudo de García *et al.* (2014) com cinco espécies de *Odontesthes*, corrobora com a colocação de Haseelman, e com os resultados deste estudo. A proximidade genética aferida pela sequência mitocondrial sugere a linhagem materna comum nos indivíduos, porém o marcador microssatélite UFPEL_OH3 serviu como ferramenta diagnóstica, sugerindo que eventos de especiação podem estar ocorrendo no ambiente.

A partir dos resultados de marcadores microssatélites (nuclear) foi possível a distinção das espécies puras e do híbrido, sendo considerado o *locus* UFPEL_OH3 o *primer* diagnóstico para o *Odontesthes*, porém a avaliação de fragmento do gene *CYTB* não demonstrou sítios de variação entre os indivíduos, necessitando de mais estudos para confirmar a hipótese.

Os resultados deste estudo servem como base para a caracterização e o monitoramento na detecção da hibridação natural de peixe-rei em ambiente natural, assim como auxilia no desenvolvimento de programas de gerenciamento e exploração adequados desses híbridos na pesca artesanal e fornecem uma compilação mais refinada de dados estatísticos.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-MUNEER, P.M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genet. Res. Int.*, v.2014, p.1-11, 2014.
- ALLENDORF, F. W. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. ***Molecular Ecology***, v. 26, n. 2, p. 420-430, 2017.
- AZIZ, A. H. A.; TARMIZI, Z.; ALI, N. M.; ARIFFIN, N. A.; ABDULLAH, M. D. D.; LIAN, W. L.; GIAT, S. Y.; AIMI, T. N.; JAAFAR, M.; BOLONG, A. M. A.; KASIM, A. A. A.; SHERIFF, S. Mitochondrial DNA Diversity of Terubok (*Tenualosa toli*) from Daro and Mukah, Sarawak Inferred by Partial Cytochrome b (Cyt-B). ***Journal of Fisheries and Aquatic Science***, v. 10, n. 2, p. 92-101, 2015.
- BEMVENUTI, M. A. Diferenciação morfológica das espécies de peixes-rei, *Odontesthes Evermann & Kendall* (Osteichthyes, Atherinopsidae) no extremo sul do Brasil: morfometria multivariada. ***Revista brasileira de Zoologia***, v. 19, n.1, p. 251-287. 2002.
- CAMPANELLA, D.; HUGHES, L. C.; UNMACK, P. J.; BLOOM, D. D.; PILLER, K. R.; ORTÍ, G. Multi-locus fossil-calibrated phylogeny of Atheriniformes. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, v. 86, p. 8-23. 2015.
- ESCHMEYER, W. N. 2013. Catálogo de Peixes: Gêneros, Espécies, Referências. Academia de Ciências da Califórnia. Disponível em: <<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>> . Acesso em: 20 de dezembro de 2019.
- GARCÍA, G.; RÍOS, N.; GUTIÉRREZ, V.; VARELA, J. G.; FERNÁNDEZ, C. B.; PARDO, B. G.; PORTELA, P. M. Promiscuous Speciation with Gene Flow in Silverside Fish Genus *Odontesthes* (Atheriniformes, Atherinopsidae) from South Western Atlantic Ocean Basins. ***Plos One***, v. 9, n. 8, p. 1-15, 2014.
- HASHIMOTO, D. T.; MENDONÇA, F. F.; SENHORINI, J. A.; BORTOLOZZI, J.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture. ***Aquaculture***, v. 298, p. 346-349, 2010.
- HASHIMOTO, D. H.; MENDONÇA, F. F.; SENHORINI, J. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. ***Aquaculture***, v. 321, p. 49-53, 2011.
- HASHIMOTO, D. H.; PRADO, F. D.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular

markers: approaches for genetic management in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 44, p. 876–884, 2013.

HASSELMAN, E. E. A.; MEGHAN, C. M.; PAUL, B.; THOMAS F. S.; ANNA, A. P.; ERIC, P. P. Human disturbance causes the formation of a hybrid swarm between two naturally sympatric fish species. **Molecular Ecology**, v. 2014, n. 23, p. 1137-1152, 2014.

KOCHZIUS, M. Trends in fishery genetics. In: BEAMISH RJ, ROTHSCHILD BJ, editors. The future of fisheries science in North America. Dordrecht, The Netherlands: Fish & Fisheries Series 31, **Springer**; pp. 453-493. 2009.

LOPERA-BARRERO, N. M. L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C. B.; LOPES, T. S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**. v. 35, n. 1, p. 65-74. 2008.

PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T.; PRADO, F. D.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic markers for the identification of hybrids among catfish species of the family Pimelodidae. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n. 2013, p. 643-647, 2013.

PRADO, F. D.; HASHIMOTO, D. T.; MENDONCA, F. F.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 1890-1894, 2011.

PRADO, F. D.; HASHIMOTO, D. T.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Detecção de híbridos e introgressão genética em populações selvagens de duas espécies de bagres (Siluriformes: Pimelodidae): O impacto de incubatórios no Brasil. **Investigação Pesqueira**, v. 125-126, p. 300-305, 2012.

RUEDA, E. C.; MULLANEY, K. A.; CONTE-GRAND, C.; HABIT, E. M.; CUSSAC, V.; ORTI, G. Displacement of native Patagonian freshwater silverside populations (*Odontesthes hatcheri*, Atherinopsidae) by introgressive hybridization with introduced *O. bonariensis*. **Biological Invasions**. v. 19, n.3, p. 971-988, 2016.

SATOH, T. P.; MIYA, M.; MABUCHI, K.; NISHIDA, M. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. **BMV Genomics**, v. 17, n. 719, p. 1-20. 2016.

TAVARES, R. A.; PIEDRAS, S. R. N.; NUNES, M. D.; ALMEIDA, D. B.; MOREIRA, C. G. A.; FERNANDES, J. M.; FREITAS, S. F.; MOREIRA, H. L. M.; POUHEY, J. L. O. F.; DIONELLO, N. J. L. Identificação de loci microssatélites com potencial de amplificação na espécie de Peixe-Rei (*Odontesthes humensis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, n. 6, p. 1941-1945. 2014.

TEJEDOR, DANIEL. El pejerrey como recurso genético. In: GROSMAN, FABIÁN. **Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey**. Editorial Astyanax, Azul, Buenos Aires, Argentina. 2001. p. 27-31.

WINGERT, J. M.; FERRER, J.; MALABARBA, L. R. Review of the *Odontesthes perugiae* species group from Río de La Plata drainage, with the description of a new species (Atherinomorpha: Atherinopsidae). **Zootaxa**, v. 4250, n. 6, p. 501-528. 2017.

7. CONCLUSÃO GERAL

Eventos epigenéticos ocorrem de forma natural nas células dos seres vivos durante toda a vida. Fatores ambientais como distúrbios antropogênicos, mudança do ambiente, alimentação ou estratégias de sobrevivência, podem causar alterações nos padrões epigenéticos no DNA e alteração na expressão dos genes.

Este estudo reforça a necessidade de monitoramento genético de espécies puras e da hibridação natural de peixe-rei em ambiente natural, para que haja melhor esclarecimento a respeito da estrutura genético-populacional de espécies nativas para auxiliar no desenvolvimento de projetos de conservação e manejo, que visam a conservação a longo prazo dos recursos pesqueiros naturais.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-MUNEER, P. M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. **Genetics Research International**, v. 2014, p. 1-11, 2014.
- ALBUQUERQUE, S. P.; CAMPOS, F. L. R.; CATELLA, A. C. **Sistema de Controle da Pesca de Mato Grosso do Sul** SCPECA/MS – 9. Boletim 31 de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Pantanal, Corumbá, n. 31, p. 47. 2002. 57p.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. H.; AITKEN, S. N. **Conservation and the Genetics of Populations**. Oxford: Wiley Blackwell Publishing; 2012.
- ALLENDORF, F. W. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 2, p. 420-430, 2017.
- AZIZ, A. H. A.; TARMIZI, Z.; ALI, N. M.; ARIFFIN, N. A.; ABDULLAH, M. D. D.; LIAN, W. L.; GIAT, S. Y.; AIMI, T. N.; JAAFAR, M.; BOLONG, A. M. A.; KASIM, A. A. A.; SHERIFF, S. Mitochondrial DNA Diversity of Terubok (*Tenualosa toli*) from Daro and Mukah, Sarawak Inferred by Partial Cytochrome b (Cyt-B). **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 10, n. 2, p. 92-101, 2015.
- BAIGÚN, C. R. M.; COLAUTTI, D. C.; GROSMAN, F. Assessment of condition in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes: Atherinopsidae) populations: which index works best?. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 439-446, 2009.
- BEHEREGARAY, L. B e SUNNUCKS, P. Microsatellite *loci* isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* species group and their use in other South American silverside fish. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 1, p. 629-644. 2000.
- BEMVENUTI, M. A. Diferenciação morfológica das espécies de peixes-rei, *Odontesthes Evermann & Kendall* (Osteichthyes, Atherinopsidae) no extremo sul do Brasil: morfometria multivariada. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 19, n.1, p. 251-287. 2002.
- CAMPANELLA, D.; HUGHES, L. C.; UNMACK, P. J.; BLOOM, D. D.; PILLER, K. R.; ORTÍ, G. Multi-locus fossil-calibrated phylogeny of Atheriniformes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 86, p. 8-23. 2015.
- CASTOE, T. A. et al. Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

CHAUHAN, Tanya. e RAJIV, Kumar. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2010, n. 1, p. 281-291, 2010.

CONOVER, D. O. e MUNCH, S. B. Sustaining fisheries yields over evolutionary time scales. **Science**, v. 297, p. 94-96, 2002.

DYER, B. S. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 69-88, 2006.

ELLEGREN, H. E GALTIER, N. Determinants of genetic diversity. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 422-433, 2016.

ESCHMEYER, W. N. 2013. Catálogo de Peixes: Gêneros, Espécies, Referências. Academia de Ciências da Califórnia. Disponível em: <<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>> . Acesso em: 20 de dezembro de 2019.

FERNANDINO, J. I.; HATTORI, R. S.; STRÜSSMAN, C. A.; YAMAMOTO, Y.; SOMOZA, G. M. Sex determination in fish: *Odontesthes spp.* (Atherinopsidae) as experimental models. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 24-27, 2015.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.

GARCÍA, G.; RÍOS, N.; GUTIÉRREZ, V.; VARELA, J. G.; FERNÁNDEZ, C. B.; PARDO, B. G.; PORTELA, P. M. Promiscuous Speciation with Gene Flow in Silverside Fish Genus *Odontesthes* (Atheriniformes, Atherinopsidae) from South Western Atlantic Ocean Basins. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. 1-15, 2014.

GROVER, A. e SHARMA ,P. C. Development and use of molecular markers: past and presente. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 36, n. 2, p. 290-302. 2016.

HASHIMOTO, D. T.; MENDONÇA, F. F.; SENHORINI, J. A.; BORTOLOZZI, J.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture. **Aquaculture**, v. 298, p. 346-349, 2010.

HASHIMOTO, D. H.; MENDONÇA, F. F.; SENHORINI, J. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. **Aquaculture**, v. 321, p. 49-53, 2011.

HASHIMOTO, D. H.; PRADO, F. D.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 44, p. 876–884, 2013.

HASSELMAN, E. E. A.; MEGHAN, C. M.; PAUL, B.; THOMAS F. S.; ANNA, A. P.; ERIC, P. P. Human disturbance causes the formation of a hybrid swarm between two naturally sympatric fish species. **Molecular Ecology**, v. 2014, n. 23, p. 1137-1152, 2014.

HILSDORF, A. W. S.; RESENDE, E. K.; MARQUES, D. K. S. **Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 43p.

INAZAWA, J.; HATTORI, R. S.; OURA, M.; YOKOTA, M.; STRÜSSMANN, C. A. Temperature effects on sex differentiation of the reciprocal hybrids of *Odontesthes bonariensis* and *Odontesthes hatcheri* (Atherinopsidae). **Aquaculture Research**, v. 2011, n. 42, p. 746-753, 2011.

KOCHZIUS M. Trends in fishery genetics. In: BEAMISH RJ, ROTHSCCHILD BJ, editors. The future of fisheries science in North America. Dordrecht, The Netherlands: Fish & Fisheries Series 31, **Springer**; pp. 453-493. 2009.

LINACRE, A. e LEE, J. C. Species determination: the role and use of the cytochrome B gene. **Methods in Molecular Biology**, v. 297, p. 45-52. 2016.

LOPERA-BARRERO, N. M. L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C. B.; LOPES, T. S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**. v. 35, n. 1, p. 65-74. 2008.

LUHARIYA, R. K.; LAL, K. K.; SINGH, R. K.; MOHINDRA, V.; PUNIA, P.; CHAUHAN, U. K.; GUPTA, A.; LAKRA, W. S. Genetic divergence in wild population of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) from nine Indian rivers, analyzed through MtDNA cytochrome b region. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 3659-3665, 2012.

MELO, D. C. et al. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 87-93, 2006.

NASCIMENTO, F.L.; CATELLA, A.C.; MORAES, A.S. **Distribuição Espacial do Tucunaré, *Cichla* sp. (Pisces, Cichlidae), peixe amazônico introduzido no Pantanal, Brasil**. Boletim 24 de Pesquisa e Desenvolvimento. Corumbá: Embrapa Pantanal, n. 24, 2001. 15p.

PETERSEN, R. L.; GARCIA, J. E.; MELLO, G.; LIEDKE, A. M. R.; SINCERO, T. C. M.; GRISARD, E. C. Análise da diversidade genética de tilápias cultivadas no estado de Santa Catarina (Brasil) utilizando marcadores microssatélites. **Boletim do Instituto de pesca**, v. 38, n. 4, p. 313-321, 2012.

PETREIRE JR, M.; BARTHEM, R. B.; CÓRDOBA, E. A.; GÓMEZ, B. C. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). In: HART, P. J. B.; PICHER, T. J. (eds.). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 14, p. 403-414. 2004.

PIEDRAS, S. R. N.; POUEY, J. L. O. F. Alimentação de alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) com dietas naturais e artificiais. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p.1203-1206, 2004.

PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T.; PRADO, F. D.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic markers for the identification of hybrids among catfish species of the family Pimelodidae. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n. 2013, p. 643-647, 2013.

PRADO, F. D.; HASHIMOTO, D. T.; MENDONCA, F. F.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 1890-1894, 2011.

PRADO, F. D.; HASHIMOTO, D. T.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Detecção de híbridos e introgressão genética em populações selvagens de duas espécies de bagres (Siluriformes: Pimelodidae): O impacto de incubatórios no Brasil. **Investigação Pesqueira**, v. 125-126, p. 300-305, 2012.

RESENDE, E. K.; HILSDORF, A. W. S.; MARQUES, D. K. S. **Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas**. Embrapa Pantanal. Corumbá, MS. 2006. 43p.

ROMIGUIER, J.; GAYRAL, P.; BALLENGHIEN, M.; BERNARD, A.; CAHAIS, V.; CHENUIL, A.; CHIARI, Y.; DERNAT, R.; DURET, L.; FAIVRE, N.; LOIRE, E.; LOURENCO, J. M.; NABHOLZ, B.; ROUX, C.; TSAGKOGEOGA, G.; WEBER, A. A. T.; WEINERT, L. A.; BELKHIR, K.; BIERNE, N.; GLEMIN, S.; GALTIER, N. Comparative population genomics in animals uncovers the determinants of genetic diversity. **Nature**, v. 515, p. 261-263, 2014.

RUEDA, E. C.; MULLANEY, K. A.; CONTE-GRAND, C.; HABIT, E. M.; CUSSAC, V.; ORTI, G. Displacement of native Patagonian freshwater silverside populations (*Odontesthes hatcheri*, Atherinopsidae) by introgressive hybridization with introduced *O. bonariensis*. **Biological Invasions**, v. 19, n.3, p. 971-988, 2016.

SATOH, T. P.; MIYA, M.; MABUCHI, K.; NISHIDA, M. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. **BMV Genomics**, v. 17, n. 719, p. 1-20. 2016.

SMITH, P.J. Genetic resources and fisheries: policy aspects. In: PULLIN, R.S.V.; BARTLEY, D.M.; KOOIMAN, J. (eds.). **Towards Policies For Conservation and Sustainable Use of Aquatic Genetic Resources**, ICLARM Conf. Proc. 59, 1999. p. 43-62.

SOMOZA, G. M.; MIRANDA, L. A.; BERASAIN, G. E.; COLAUTTI, D.; LENICOV M. R.; STRÜSSMANN, C. A. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 784-793, 2008.

TAVARES, Rafael Aldrighi. **Estudo genético de duas populações de *Odontesthes bonariensis* através de marcadores microssatélites**.2010.70f. Dissertação

(Programa de Pós Graduação em Zootecnia /Melhoramento Animal) .Universidade Federal de Pelotas. Pelotas-RS. 2011.

TAVARES, R. A.; NUNES, M. D.; ALMEIDA, D. B.; SILVA, J.C.; VAZ, B, S.; MOREIRA, C. G. A.; DIONELLO, N. J. L.; PIEDRAS, S. R. N.; MOREIRA, H. L. M. Utilization of microsatellite markers to form families of "pejerrey" *Odontesthes bonariensis* in a genetic breeding program. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1263-1267. 2011.

TAVARES, R. A.; PIEDRAS, S. R. N.; NUNES, M. D.; ALMEIDA, D. B.; MOREIRA, C. G. A.; FERNANDES, J. M.; FREITAS, S. F.; MOREIRA, H. L. M.; POUHEY, J. L. O. F.; DIONELLO, N. J. L. Identificação de loci microssatélites com potencial de amplificação na espécie de Peixe-Rei (*Odontesthes humensis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, n. 6, p. 1941-1945. 2014.

TEJEDOR, DANIEL. El pejerrey como recurso genético. In: GROSMAN, FABIÁN. **Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey**. Editorial Astyanax, Azul, Buenos Aires, Argentina. 2001. p. 27-31.

VIEIRA, M. L. C.; SANTINI, L.; DINIZ, A. L.; MUNHOZ, C.F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312-228, 2016.

WANG, L.; SHI, X.; SU, Y.; MENG, Z.; LIN, H. Loss of Genetic Diversity in the Cultured Stocks of the Large Yellow Croaker, *Larimichthys crocea*, Revealed by Microsatellites. **International Journal of molecular sciences**, v. 13, n. 5, p. 5584-5597. 2012.

WINGERT, J. M.; FERRER, J.; MALABARBA, L. R. Review of the *Odontesthes perugiae* species group from Río de La Plata drainage, with the description of a new species (Atherinomorpha: Atherinopsidae). **Zootaxa**, v. 4250, n. 6, p. 501-528. 2017.