

Bianca Maria Soares Scaranto

**Caracterização genética do jundiá (*Rhamdia quelen*) por meio do
DNA *barcode* e marcadores microssatélites**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Dr. Evoy Zaniboni Filho
Coorientadora: Dra. Josiane Ribolli

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Scaranto, Bianca Maria Soares
Caracterização genética do jundiá (*Rhamdia
quelen*) por meio do DNA barcode e marcadores
microssatélites / Bianca Maria Soares Scaranto ;
orientador, Evoy Zaniboni Filho; coorientadora,
Josiane Ribolli - SC, 2017.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. DNA Mitocondrial. 3. DNA
Nuclear. 4. MOTUs. I. Zaniboni Filho, Evoy . II.
Ribolli, Josiane . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura. IV. Título.

**Caracterização genética do jundiá (*Rhamdia quelen*) por meio do
DNA barcode e marcadores microssatélites**

Por

BIANCA MARIA SOARES SCARANTO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.




Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

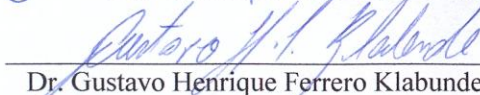
Banca Examinadora:



Dr. Evoy Zaniboni Filho – *Orientador*



Dra. Andrea Rita Marrero - UFSC



Dr. Gustavo Henrique Ferrero Klabunde - UFSC



Dr. Raphael de Leão Serafini - EPAGRI

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer à Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de fazer o curso de Pós-Graduação em Aquicultura.

Ao orientador Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

Agradeço em especial à coorientadora Dra. Josiane Ribolli, pelos ensinamentos, paciência e incentivos durante este período.

A todos os funcionários, técnicos, professores e alunos do LAPAD.

Às agências de fomento, CNPq, FAPESC e CAPES.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, pela cessão da infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus familiares, gostaria de agradecer pelo apoio durante esta jornada. Ao meu pai Reni, minha mãe Elza, minhas irmãs Daniela, Sabrina e Fabíola, meus cunhados Orion, Daniel e André, e meu marido Flavio.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Andrea Rita Marrero, Dr. Gustavo Henrique Ferrero Klabunde e Dr. Raphael de Leão Serafini.

À todos, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

O gênero *Rhamdia* é composto por espécies morfológicamente semelhantes e com ampla distribuição geográfica. O jundiá *Rhamdia quelen* destaca-se entre elas, com grande participação na piscicultura do Sul do Brasil. Apesar de sua relevância para o cultivo, a identificação atualmente é incerta, e comercialização é feita normalmente pela denominação jundiá. A caracterização genética através do DNA *barcode* e de marcadores microssatélites é de grande importância para o crescimento da piscicultura continental. O presente estudo teve como objetivo utilizar o gene COI para investigar o número de unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTUs), definir o ótimo *threshold* (OT) a partir do conjunto de dados analisados, e determinar a diversidade e a estrutura genética através de marcadores microssatélites. Para análise do gene COI foram utilizadas 85 indivíduos oriundos de cultivos comerciais de Santa Catarina (SC), Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS), selvagens do rio Uruguai além de sequências referência do BOLD. Três MOTUs foram definidas a partir do OT (1,73%). O número de clados obtidos pela árvore NJK2P corroborou com o número de MOTUs obtidas. As análises dos marcadores microssatélites foram realizadas com 90 indivíduos de jundiá de cultivos comerciais e selvagens do sul do Brasil. As análises de estrutura genética populacional suportam existência de três unidades genéticas distintas, sendo uma formada por indivíduos provenientes de cultivos dos estados de SC e PR, outra de indivíduos oriundos do rio Uruguai, e uma terceira de indivíduos de cultivo oriundas do RS. A análise bayesiana indicou que alguns indivíduos analisados representam o resultado cruzamentos entre indivíduos de distintas unidades genéticas. Os resultados indicaram que *R. quelen* é formada por diferentes MOTUs, sugerem que ocorre intercâmbio de indivíduos correspondentes às distintas unidades moleculares dos diferentes locais de cultivo analisados e alta diversidade genética. Os marcadores moleculares utilizados neste estudo se mostraram eficientes para definição de grupos genéticos, o que possibilita que os cultivos analisados a partir dos resultados obtidos neste estudo comecem a desenvolver programas de melhoramento genético. Este trabalho sugere que não sejam feitos programas de repovoamentos com peixes oriundos de cultivos comerciais.

Palavras-chaves: Aquicultura, DNA Mitocondrial, DNA Nuclear, MOTUs.

ABSTRACT

The *Rhamdia* genus is composed by morphologically similar species with wide geographic distribution. The *Rhamdia quelen* jundiá stands out with a great participation in fish-farm of the South of Brazil. Despite its relevance for cultivation, currently the identification is uncertain, and its commercialization is usually done just by the denomination jundiá. The genetic characterization through DNA barcode and microsatellite markers has great importance for the growth of continental fish farming. The aim of the present study was to use the Mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COI) gene to investigate the number of molecular operational taxonomic units (MOTUs), to define the optimal threshold (OT) from the analyzed data set and to determine the diversity and the genetic structure through microsatellite markers. In order to analyze the COI gene 85 individuals were used in this study coming from commercial cultivation from states of Santa Catarina (SC), Paraná (PR) and Rio Grande do Sul (RS), savages from Uruguai river. Three MOTUs were defined from OT of 1,73%. The number of clades obtained by NJK2P tree has corroborated with the number of obtained MOTUs. The analyses of the microsatellite markers were realized with 90 individuals of jundiás from commercial cultivation and wild from the south of Brazil. The analyses of population genetic structure support the existence of three distinct genetic units, one from individuals from SC and PR cultivation, another from Uruguai river and a third composed by individuals coming from RS. The bayesian analysis has indicated that some analyzed individuals represent the result of the crossing of individuals from distinct genetic units. The results indicated that *R. quelen* is formed by different MOTUs and suggest that occurs an interchange of individuals coming from distinct molecular units belong to different analyzed cultivation sites and high genetic diversity. The molecular markers used in this study has proved to be efficient for definition of genetic groups, and this enables that analyzed cultures from the obtained results in this study start to develop genetic breeding programs. This paper suggests that restocking programs with fishes coming from commercial cultivations does not be done.

Key-words: Aquaculture, Mitochondrial DNA, Nuclear DNA, MOTUs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARU	Alto rio Uruguai
BOLD	Barcode of Life Data System
CAC	Caçador
CAM	Camboriú
CANO	Canoinhas
COI	Citocromo oxidase subunidade I
D _G	Diversidade genética
DNA	Ácido desoxirribonucleico
F _{is}	Coefficiente de endocruzamento
F _{st}	Divergência genética
GAS	Gaspar
H _E	Heterozigosidade esperada
H _O	Heterozigosidade observada
K	Número de grupos geneticamente homogêneos
K2P	Kimura 2 parâmetros
MCMC	Monte Carlo via Cadeias de Markov
MOTUs	Unidades taxonômicas operacionais moleculares
MRU	Médio rio Uruguai
N	Número de indivíduos
N _A	Número de alelos
NJ	Neighbor-joining
NJK2P	Neighbor-joining Kimura 2 parâmetros
OT	Ótimo <i>threshold</i> (OT)
OTUs	Unidades taxonômicas operacionais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG8000	Polietilenoglicol 8000
P _L	Probabilidade de déficit de heterozigotos
P _S	Probabilidade de excesso de heterozigoto
R _A	Riqueza alélica
SM	Santa Maria
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
TOL	Toledo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Árvore filogenética NJK2P gerada a partir de sequências COI obtidas no BOLD para indivíduos de *Rhamdia quelen*, e dos grupos externos (*R. guatemalensis* e *Pimelodella* sp.). Origem das sequências (FPSR e MUCU: Paraíba do Sul; FARGB: Pampa Argentino; BSB: Santana do Riacho, rio São Francisco; FUPR: Rio São Francisco; ITAPE: Rio Itapecuru, Nordeste brasileiro; MEFM: México; HM: *Pimelidella* sp. 38
- Figura 2: Arvore filogenética de NJK2P mostrando o agrupamento das linhagens pela distância, gerada no programa MEGA a partir de sequências de *R. quelen*, *R. guatemalensis* e *Pimelodella* sp., do gene COI. Linhas Verde: MOTU 1, Vermelha: MOTU 2, Azul: MOTU 3. Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM). 41
- Figura 3: Gráfico de L(K) (A) e Delta K (B) para *R. quelen*, obtidos através da análise de atribuição bayesiana do programa Structure sem informação *a priori* da origem dos indivíduos. A representação gráfica foi obtida através do programa Structure Harvester. 43
- Figura 4: Resultados do agrupamento para K=3 de *R. quelen* obtido através da análise bayesiana no programa Structure. Os indivíduos são representados como colunas e as linhas pretas delimitam os grupos amostrais. Números laterais indicam a proporção genética pertencente a cada agrupamento. ARU=1, CAC=2, CANO=3, CAM=4, GAS=5, SM=6, TOL=7 e MRU=8. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Local de origem e número de indivíduos estudados.....	27
Tabela 2 Distâncias intra-MOTU (em negrito) e inter-MOTU, de <i>R. quelen</i> com base no agrupamento gerado pela árvore de NJK2P e pelas análises no jMOTU. Distâncias geradas no programa MEGA para gene COI.	42
Tabela 3: Caracterização dos oito grupos amostrais de <i>R. quelen</i> , número de indivíduos (N); número de alelos (N_A); riqueza alélica (R_A); diversidade gênica (D_G), heterozigosidade observada (H_o); heterozigosidade esperada (H_E); coeficiente de endocruzamento (F_{is}); probabilidade de déficit de heterozigotos (P_L); probabilidade de excesso de heterozigoto (P_S). Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM).....	43
Tabela 4: Diferenciação genética estimada pelo índice de fixação (F_{st}) dos grupos amostrais de <i>R. quelen</i> ,. Análises par-a-par através do programa Fstat, com valores de p acima da diagonal e de F_{st} abaixo. (Valores significativos de F_{st} estão apresentados em negrito). Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM).	45

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
OBJETIVOS	25
Objetivo geral	25
Objetivos específicos	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
Amostragem e extração de DNA.....	27
Amplificação dos fragmentos de DNA <i>barcode</i> (gene COI) e Análise de Dados	27
Amplificação dos Marcadores Moleculares Microsatélites (SSR) e Análise dos Dados	29
ARTIGO CIENTÍFICO	31
DNA <i>barcode</i> e microsatélites para caracterizar MOTUs de <i>Rhamdia quelen</i> (Heptapteridae: Siluriformes) no Sul do Brasil...	31
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
Amostragem e extração de DNA.....	35
Amplificação dos fragmentos de DNA <i>barcode</i> (gene COI) e Análise de Dados	36
RESULTADOS	37
Análises da diversidade e estrutura genética através de Marcadores Microsatélites.....	42
DISCUSSÃO	45
AGRADECIMENTOS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL E MATERIAL E MÉTODOS GERAL	61
APÊNDICES	71
Apêndice I: Tabela de indivíduos analisados no estudo ID (número de identificação), espécie, nome comum (Nome), localidade, selvagem, comercial, COI, SSR, voucher.	71
Apêndice II: Fotos vouchers: Santa Maria, Canoinhas, Gaspar, Alto rio Uruguai, Toledo, Caçador e Médio rio Uruguai.	75
Apêndice III: Tabela de sequencias COI de indivíduos obtidos da base de dado da BOLD e GenBanK.	76

Apêndice IV: Sequencias completas de COI, com destaque para sítios variáveis informativos. Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM).	78
Apêndice V: Tabela dos indivíduos analisados, pertencendo a cada uma das MOTUs obtidas pelo programa Jmotu. Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM).....	79
Apêndice VI: Caracterização de <i>R. quelen</i> dos sete locos microssatélites, número de indivíduos (N); número de alelos (NA); riqueza alélica (RA); diversidade genética (DG), heterozigosidade observada (Ho); heterozigosidade esperada (HE); coeficiente de endocruzamento (Fis); probabilidade de déficit de heterozigotos (PL); probabilidade de excesso de heterozigoto (PS).	80
Apêndice VII: Gráfico plotagem em múltiplas linhas de atribuição individual de <i>R. quelen</i> , gerado através da análise bayesiana, no programa Structure. Cada cor representa os possíveis agrupamentos genéticos. Alguns grupos são predominantes formados por indivíduos de determinada origem: vermelho - indivíduos selvagens (Alto e Médio rio Uruguai); azul - indivíduos de cultivos comerciais de Canoinhas, Gaspar e Camboriú; verde - indivíduos de cultivo comercial (Santa Maria) e Toledo apresenta uma mistura de todos os grupos genéticos.....	83
Apêndice VIII: Resultados comparativos entre as análises de <i>barcode</i> (árvore NJK2P) e microssatélites de <i>R. quelen</i> . Linhas Verde: MOTU 1, Vermelha: MOTU 2 , Azul: MOTU 3. Sendo: Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM).	84
ANEXOS.....	86
Anexo I: Protocolo de extração de DNA proposto por Aljanabi; Martinez (1997) com algumas modificações.	86
Anexo II: Purificação de PCR utilizando Peg 8000 Lis; Schleif (1975).....	87
Anexo III: Protocolo de Precipitação da Reação de Sequenciamento: Etanol, Acetato/ EDTA.....	88

INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura têm crescido de forma substancial nas últimas décadas, como consequência do aumento da demanda da proteína animal e a diminuição dos estoques pesqueiros. A produção mundial de pescado (pesca e aquicultura) em 2014 foi de 167,2 milhões de toneladas, dessas, 146.3 milhões foram utilizados no consumo humano (FAO, 2016). Dentro produção mundial de pescado em 2014, a pesca foi responsável por 93,4 milhões de toneladas e a aquicultura por 73,8 milhões, esta última com um aumento de 202% no período de 1995-2014. No panorama mundial os peixes são os organismos aquáticos mais cultivados, com uma produção de aproximadamente 50 milhões de toneladas em 2014, com destaque para as espécies continentais, que são as mais produzidas pela atividade da aquicultura (FAO, 2016).

No Brasil a aquicultura produziu aproximadamente 575,1 mil toneladas em 2015, e semelhante a tendência mundial, o grupo mais cultivado é composto pelos peixes continentais, com 483,24 mil toneladas em 2015 (IBGE, 2016). Os principais estados produtores de peixes foram Rondônia (84,49 mil toneladas), Paraná (69,26 mil toneladas), Mato Grosso (47,43 mil toneladas), Santa Catarina (33,74 mil toneladas) e São Paulo (31,14 mil toneladas) (IBGE, 2016). A região Sul do Brasil se destacou no cultivo de peixes continentais em 2015, com 24,4% da produção nacional (IBGE, 2016), com a produção concentrada principalmente em espécies exóticas como tilápias e carpas (EPAGRI, 2012). Em contrapartida, a produção de espécies nativas começou a apresentar alguma expressão no cenário nacional nos últimos anos, como é o caso do jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1924). Segundo dados do SEBRAE (2015), no período de 2007 a 2011 a produção nacional de jundiá apresentou um aumento de 161%, sendo o 14º peixe mais cultivado no ano de 2011.

Além de ser a espécie nativa de água doce mais cultivada no Sul do Brasil, o jundiá têm sido objeto de inúmeros estudos nos últimos anos, buscando aperfeiçoar as técnicas de cultivo da espécie no âmbito da nutrição (LOVATTO et al., 2013; TYSCA et al., 2013), reprodução em cativeiro (BOMBARDELLI et al., 2006; GHIRALDELLI et al., 2008; COLDEBELLA et al., 2011), melhoramento genético (GARCIA et al., 2017), produção em cativeiro (CARNEIRO, 2004; BALDISSEROTTO; RADÜNZ; BARCELLOS, 2010), desempenho zootécnico (POUEY et al., 2011; ENKE et al., 2013), manejo (FABREGAT et al., 2015), sanidade (DIAS et al., 2016), estresse (GRESSLER et al., 2012) e técnicas cirúrgicas (FERANTI et al., 2015).

Além disso, o jundiá foi testado como bioindicador de poluentes para estudo de impactos ambientais (MELA et al., 2013).

R. quelen é um tipo de bagre com ampla distribuição na região Neotropical e habita diversos ambientes aquáticos, incluindo rios, riachos e lagoas (BOCKMANN;GUAZZELLI, 2003). Encontra-se entre as espécies mais cultivadas por piscicultores da região Sul do Brasil, por apresentar diversas características de interesse zootécnico (ZANIBONI-FILHO, 2004; SEBRAE, 2015), como resistência ao manejo e tolerância a baixas temperaturas (CARNEIRO, 2002), alta taxa de fertilização (CARNEIRO, 2002; AMORIM et al., 2009) e boa aceitação pelo mercado consumidor (LOPES et al., 2006). Além disso, o cultivo de *R. quelen* poder ser realizado desde a fase de alevinagem até a engorda tanto em tanques-rede como em viveiros escavados (CARNEIRO, 2004; AMARAL JUNIOR; GARCIA; MELLO, 2011).

Apesar de apresentar características favoráveis para cultivo e ser alvo de diversos estudos científicos, é recorrente o questionamento sobre as diversas espécies que compõem o gênero *Rhamdia*, onde praticamente todas são conhecidas comumente como jundiá (BALDISSEROTTO, RADÜNZ; BARCELLOS, 2010). Em uma revisão taxonômica do gênero *Rhamdia* realizada em 1996 por Silfvergrip, cerca de 100 espécies descritas foram agrupadas em apenas 11 espécies válidas (detalhes ver REIS et al., 2003). Segundo essa revisão proposta, *R. quelen* apresenta 49 espécies consideradas sinônimas, dentre elas *Rhamdia branneri* Haseman 1911e *Rhamdia voulezi* Haseman 1911. Contudo, segundo Anza (2006), o trabalho de Silfvergrip tornou a diagnose para *R. quelen* excessivamente ampla e generalista, imprópria para caracterização e reconhecimento da espécie, pois o autor descreve que várias populações de *R. quelen* podem ser diagnosticadas como “*rare character states*” (estados de caracteres raros), e considera que todas essas populações pertencem à uma única espécie, correlacionando as diferenças à variação geográfica.

Dentre os trabalhos que contestam a tese de Silfvergrip está o de Abucarma; Martins-Santos (2001) realizado na bacia do Rio Iguaçu com as espécies *R. branneri*, *R. voulezi* e *Rhamdia* sp., onde os autores apontam que as espécies estudadas apresentam características distintas relacionadas ao cariótipo. Baumgartner et al. (2012) publicaram uma chave de identificação para peixes do baixo rio Iguaçu, na qual descrevem *R. branneri*, *R. voulezi* como espécies distintas, que foram recentemente confirmadas como espécies válidas através da metodologia de DNA *barcode* (Ribolli et al., 2017). Questões envolvendo relações entre espécies, indivíduos e populações podem ser

estudados e melhor interpretados através de metodologias de biologia molecular, como a comparação de partes do genoma de espécies (AVISE, 2004).

Buscando elucidar problemas taxonômicos, diagnosticar possíveis equívocos e facilitar a identificação das espécies, Hebert et al. (2003) desenvolveram a técnica do DNA *barcode*. Essa metodologia é uma ferramenta de identificação amplamente aceita que propõe a realizar uma descrição da biodiversidade global que é usado por quase todos os grupos de animais, utilizando uma porção gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI), esta região é universal e variável o suficiente para discriminação de espécies próximas e indivíduos da mesma espécie (HEBERT et al., 2003). Esta sequência do DNA, com aproximadamente 650 pb foi utilizada na descrição da diversidade, na identificação de espécies e de espécies crípticas (HEBERT et al., 2003; HEBERT et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2016), na descrição da biodiversidade da ictiofauna Neotropical (PEREIRA et al., 2013; HENRIQUES et al., 2015), e na fiscalização do comércio ilegal de filés (CARVALHO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2016). Adicionalmente a aplicação da metodologia em diversos estudos científicos, foi criado um banco de dados online denominado BOLD (*Barcode of Life Data System*) que permite o depósito, consulta e a obtenção de sequências (RAMIREZ; GALETTI Jr., 2015; BRANDÃO et al., 2016). Também foi criado, especificamente para peixes, o banco de dados denominado *Fish Barcode of Life* (FISH-BOL), que visa depositar e disponibilizar sequências de DNA *barcode* exclusivamente de peixes, permitindo a associação entre a identificação molecular e a identificação taxonômica das espécies de peixes (STEINKE; HANNER, 2011).

O DNA *barcode* demonstra-se eficiente e vantajoso em grupos animais, pois utiliza uma curta região do DNA suficiente para ser sequenciado de forma rápida e econômica, todavia ainda longa o suficiente para identificar variações entre as espécies (AZEREDO, 2005). A metodologia pode ser utilizada a partir de DNA obtido de indivíduos em todos os estágios de vida dos espécimes (ovos a adultos) e pequenos fragmentos amostrais (STOECKLE, 2003), bem como seus produtos (filés, enlatados) na detecção de fraudes ou substituição de espécies em transações comerciais (SMITH et al., 2008). Além disso, quando associado a recurso de bioinformática têm sido utilizado para agrupar e delimitar *clusters* de sequências (que atuam como representantes dos genomas dos quais são derivados) em unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTU) (FLOYD et al., 2002; BLAXTER; FLOYD 2003; JONES et al., 2011). A delimitação de

MOTUs é utilizada como um complemento às limitações da sistemática convencional para a identificação taxonômica em diversos estudos de biodiversidade, pois permite identificações rápidas e eficientes de organismos que são difíceis de estudar morfológicamente (BLAXTER, 2006; VALENTINI et al., 2009; KNOX et al., 2012; CIVADE et al., 2016). Ratnasingham; Herbert (2013) assinalam as principais razões para as diferenças entre a identificação de MOTUs por diferentes abordagens: i) erro taxonômico, ii) contaminação de sequência, iii) déficits na metodologia, iv) incapacidade da variação das sequências COI para identificar as espécies por causa da introgressão ou por serem jovens. Segundo esta proposta, cada *cluster* de sequências pode ser atribuída a diferentes MOTUs, e a ele são designados diferentes valores de corte de similaridade, este valor de corte agindo como um parâmetro para o algoritmo de agrupamento (JONES et al., 2011). Deste modo, ao comparar as MOTUs geradas pelas árvores filogenéticas juntamente com sequências referência (obtidas do banco de dados BOLD) é possível sugerir uma atribuição taxonômica (BLAXTER; FLOYD, 2003; BLAXTER et al., 2005) ou a uma unidade taxonômica operacional (OTU), usada frequentemente em estudos de biodiversidade, pois atribuem diferenças morfológicas percebidas como indicadores de limites de espécies (RATNASINGHAM; HEBERT, 2013).

No contexto de estudos populacionais, marcadores moleculares são os mais adequados para investigar relações entre indivíduos dentro e entre populações. Os marcadores moleculares microssatélites *Simple Sequence Repeats* (SSR), foram descrito na década de 80 por Tautz (1984), Litt; Luty (1989), Weber; May (1989), e consistem em sequências curtas de DNA com um a seis nucleotídeos de comprimento repetidos em *tandem*. Estes marcadores podem ser encontrados em todo o genoma e são instrumentos amplamente utilizados para aferir parentescos, hibridização e parâmetros populacionais (ELLEGRÉN, 2004; GUICHOUX et al., 2011). Os marcadores microssatélites apresentam altas taxas de mutação e alto polimorfismo, características que são importantes para genética animal, não somente na identificação individual e na determinação de parentesco, mas também por poderem ser empregados em programas de melhoramento animal (FERGUSON et al., 1995; MELO et al., 2008), permitindo estabelecer diretrizes para estratégias de manejo genético através da inferência das distâncias genéticas existentes nos plantéis de reprodutores, além das estimativas de diversidade e variabilidade genética e da própria inferência da

estruturação populacional (MOREIRA et al., 2007; LOPES et al., 2009; RIBOLLI et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016).

O uso de marcadores moleculares tanto nucleares como mitocondriais, são de fundamental importância para desenvolvimento em programas de pisciculturas, pois permitem o manejo adequando e direcionado na parte de produção, manejo e comercialização (MIA et al., 2005; BARROSO et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2016): i) pois auxiliam na correta identificação das espécies cultivadas (MELO et al., 2008; HASHIMOTO et al., 2011; KARIM et al., 2015; ii) permitem a definição e a distinção de unidades genéticas dentro do plantel de reprodutores, sendo assim possível tratá-las de forma independente e isolada, evitando assim a criação de híbridos não-intencionais (MMA, 2009); iii) auxiliam na detecção de fraudes ou na substituição de espécies em todos os estágios de vida (ovos a adultos) e em transações comerciais (SMITH et al., 2008); iv) evitam a comercialização equivocada de híbridos como sendo espécies puras (CARVALHO et al., 2008; HASHIMOTO et al., 2014; HASHIMOTO et al., 2016) e v) previnem a contaminação genética tanto dentro dos cultivos como dos estoques naturais, devido ao escape e a comercialização (HASHIMOTO et al., 2011).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar o número de MOTUs, a diversidade e a estrutura genética de *Rhamdia quelen* oriundos de estações de cultivo da região Sul do Brasil e de indivíduos selvagens provenientes da bacia do Alto e Médio Rio Uruguai, por meio do DNA *barcode* e marcadores microssatélites para verificar a quantidade de unidades genéticas que estão sendo cultivadas no Sul do Brasil.

Objetivos específicos

- Inferir o ótimo *threshold* (OT) de *R. quelen* oriundos de cultivo e do ambiente natural da região Sul do Brasil através do DNA *barcode*;
- Identificar o número de MOTUs de *R. quelen* cultivadas e comercializadas na região Sul do Brasil;
- Inferir a distância inter e intraespecífica dos MOTUs de *R. quelen* obtidos por meio do DNA *barcode*;
- Estimar a diversidade genética de *R. quelen* através de marcadores microssatélites de indivíduos oriundos de cultivo e ambiente natural da região Sul do Brasil;
- Inferir a estrutura genética de *R. quelen* de indivíduos oriundos de cultivo e do ambiente natural da região Sul do Brasil através da utilização de marcadores microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e extração de DNA

Foram coletadas amostras de nadadeiras de *R. quelen* identificados com o nome comum “jundiá”, de diferentes estações de pisciculturas comerciais dos estados de Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS) e do Paraná (PR), além de peixes oriundos da bacia do Rio Uruguai totalizando 93 indivíduos (Tabela 1 e Apêndice I). As amostras de tecido foram acondicionadas em microtubos de 2,0 ml contendo etanol 96% e armazenadas em freezer a -20 °C. Além das nadadeiras foram coletados *Vouchers* e imagens fotográficas de exemplares de cada grupo amostral (Apêndice II) para posterior identificação taxonômica e registro dos indivíduos no BOLD. O DNA foi extraído seguindo o protocolo proposto por Aljanabi; Martinez (1997), com algumas modificações (Anexo I).

Tabela 1: Local de origem e número de indivíduos estudados.

Origem	Número de Indivíduos	Voucher	Foto
Comercial Gaspar (SC)	14	X	X
Comercial Santa Maria (RS)	10		X
Comercial Toledo (PR)	10	X	X
Comercial Camboriú (SC)	7		
Comercial Canoinhas (SC)	6	X	X
Comercial Caçador (SC)	7	X	X
Selvagem Alto rio Uruguai	16	X	X
Selvagem Médio rio Uruguai	23	X	X
Total	93		

Amplificação dos fragmentos de DNA *barcode* (gene COI) e Análise de Dados

A amplificação da região 5' do gene COI, foi realizada utilizando um conjunto de *primers* descritos por Ward et al. (2005), FishF1 (5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3') e FishR1 (5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3') em 77 indivíduos.. A reação para amplificação seguiu o protocolo proposto por Bellafronte et al. (2013): 2 µl de DNA (50 ng), 2 µl de DNTP (2,5 mM), 0,7 µl de MgCl₂ (50 mM), 2,5 µl de tampão 10x, 0,5µl de cada *primer* F e R (0,8 pmol/ µl), 0,2 µl de enzima *taq* polimerase e 16,6 µl de água Milli-Q, em um volume final de 25 µl. O programa de amplificação utilizado

consistiu em um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos. Os segmentos de DNA amplificados foram verificados em gel de agarose 1%. Os produtos obtidos foram purificados com reagente contendo 20% de PEG8000 (Polietilenoglicol 8000) em solução de NaCl 2,5 M, segundo protocolo descrito por Lis; Schleif (1975) (Anexo II). Após purificados, os produtos de PCR foram submetidos a uma nova amplificação utilizando o kit de sequenciamento comercial Big Dye Terminators v3. Realizaram-se duas reações, uma para cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*), onde cada reação foi preparada para um volume final de 20 µl contendo 4,0 µl do *primer forward* ou *reverse* (0,8 pmol/ µl), 1,0 µl de Big Dye, 3,0 µl de tampão 5x, 1,0 µl do produto amplificado (200 ng), e 11 µl de água Milli-Q. O programa de amplificação consistiu em um passo inicial de desnaturação a 96 °C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos, seguido de um passo final de extensão a 7 °C. O produto gerado pela segunda amplificação foi precipitado com etanol, acetato/EDTA, 10 µl de formamida, posteriormente desnaturado por 5 minutos a 95 °C e em seguida exposto ao gelo por 3 minutos (Anexo III). O sequenciamento foi realizado no equipamento Applied Biosystems 3500xLe os eletroferogramas visualizados por meio do software Sequencing Analysis v5.3.1.

As sequências consenso COI obtidas foram alinhadas e editadas através da ferramenta *Clustal W*, no programa BioEdit v7.2.5 (HALL, 1999), combinadas com as sequências COI de referência das espécies do gênero *Rhamdia* disponíveis no banco de dados da BOLD: *R. quelen* (n=6) (código: FARG317-07; FARGB235-11; FARGB236-11; FPSR094-09; FPSR095-09; FPSR096-09) e sequências utilizadas como grupo externo: *R. guatemalensis* (código: EU751962.1) e *Pimelodella* sp. (código: HM376392.1) (Apêndice III), totalizando 86 sequências.

O programa computacional MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) foi utilizado para análise de distância de *Neighbor-Joining* (NJ). As análises foram geradas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) e com taxas de variação uniformes entre os sítios, este modelo leva em consideração probabilidades diferentes de transições e transversões. O suporte dos cladogramas foram avaliados com 10.000 replicações de *bootstrap*. A matriz de distância genética foi utilizada para estimar as distâncias dentro e entre os grupos genéticos obtidos pela árvore de

NJK2P. O pacote SPIDER (*SPecies IDentity and Evolution in R*; Brown et al., 2012), analisado na plataforma R (<http://www.R-project.org>) foi utilizado inicialmente para calcular a mínima distância interespecífica, ótimo *threshold* (OT), afim de definir as unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTUs). O OT foi calculado utilizando a função *localMinima* e sem o conhecimento *a priori* sobre a identidade dos indivíduos. O programa computacional jMOTU (JONES et al., 2011) foi utilizado para calcular o número de MOTUS (Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares).

Amplificação dos Marcadores Moleculares Microssatélites (SSR) e Análise dos Dados

A amplificação dos microssatélites foi realizada por meio de PCR, utilizando um conjunto de sete loci específicos para *R. quelen* (Rhq2, Rhq7, Rhq13, Rhq15, Rhq20, Rhq26, Rhq28; RÍOS et al., 2013) em 90 indivíduos. As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 12 µl, contendo 2,0 µl de DNA (50 ng), 1,4 µl de tampão 10x (1x), 0,6 µl de dNTPs (0,2mM), 0,4 µl de MgCl₂ (2Mm), 0,2 µl de cada *primer* (5 pmol), 0,2 µl de *Taq polimerase* (1 unidade) e 7,0 µl de água Milli-Q. Os produtos amplificados foram diluídos a uma proporção de 1:10 ou 1:15 (produto PCR: Água Milli-Q). Posteriormente, misturou-se 1 µl do produto diluído, 8,75 µl de formamida e 0,25 µl de GeneScan 600 Liz Applied Biosystems).

Os produtos da amplificação foram genotipados em sequenciador automático Applied Biosystems 3500xL. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas GeneAlex 6.5, Structure 2.3, Fstat. Inicialmente o programa Structure (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000; FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2003) foi utilizado para determinar a estruturação genética populacional. Ele utiliza a técnica de *clustres* bayesianos, juntamente com o algoritmo Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) para detectar o número de grupos geneticamente homogêneos (*K*). A análises para determinar o número de agrupamentos foi realizada sem informação *a priori* da origem dos indivíduos. A maioria dos parâmetros foi configurada de acordo com os seus valores *default*, sugerido pelos autores do programa, e modelo *Admixture*. Para cada valor de *K* (1 a 8) foram realizadas seis corridas independentes, e para cada uma delas foram realizadas 500.000 MCMC, após um período de corte inicial (*burn-in*) de 200.000 interações. O logaritmo da probabilidade dos dados $\ln P(D/K)$ (PRITCHARD; STEPHENS;

DONNELLY, 2000) e as estimativas de DeltaK (EVANNO et al., 2005) foram determinadas através do programa Structure Harvester (EARL; VONHOLDT, 2011). A divergência genética (F_{ST}) entre as populações foi testada par-a-par entre os grupos amostrais. O número de alelos (N_A), heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) foram obtidas através do programa GeneAlex 6.5 (PEAKALL;SMOUSE, 2012). As estimativas de riqueza alélica (R_A) e índice de endocruzamento (F_{IS}) e valores de p para déficit e excesso de heterozidade foram calculados no programa Fstat 2.9.3.2 (GOUDET, 2002).

ARTIGO CIENTÍFICO

DNA *barcode* e microssatélites para caracterizar MOTUs de *Rhamdia quelen* (Heptapteridae: Siluriformes) no Sul do Brasil.

Bianca Maria Soares Scaranto¹, Josiane Ribolli¹ & Evoy Zaniboni Filho¹

¹Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce - Universidade Federal de Santa Catarina / CCA/ Departamento de Aquicultura Rodovia SC 406, nº 3532 – Lagoa do Peri - Florianópolis – Santa Catarina – Brasil – 88066-000. Emai¹biascaranto@gmail.com

Os resultados dessa pesquisa serão submetidos em forma de artigo científico para a revista *Aquaculture Research* (ISSN online: 1365-2109). Qualis A2 Área de atuação Zootecnia / Recursos Pesqueiros. Fator de impacto: 1.606.

ABSTRACT

The *Rhamdia* genus is composed by morphologically similar species with wide geographic distribution. The *Rhamdia quelen* jundiá stands out with a great participation in fish-farm of the South of Brazil. Despite its relevance for cultivation, currently the identification is uncertain, and its commercialization is usually done just by the denomination jundiá. The genetic characterization through DNA barcode and microsatellite markers has great importance for the growth of continental fish farming. The aim of the present study was to use the Mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COI) gene to investigate the number of molecular operational taxonomic units (MOTUs), to define the optimal threshold (OT) from the analyzed data set and to determine the diversity and the genetic structure through microsatellite markers. In order to analyze the COI gene 85 individuals were used in this study coming from commercial cultivation from states of Santa Catarina (SC), Paraná (PR) and Rio Grande do Sul (RS), savages from Uruguai river. Three MOTUs were defined from OT of 1,73%. The number of clades obtained by NJK2P tree has corroborated with the number of obtained MOTUs. The analyses of the microsatellite markers were realized with 90 individuals of jundiás from commercial cultivation and wild from the south of Brazil. The analyses of population genetic structure support the existence of three distinct genetic units, one from individuals from SC and PR cultivation, another from Uruguai river and a third composed by individuals coming from RS. The bayesian analysis has indicated that some analyzed individuals represent the result of the crossing of individuals from distinct genetic units. The results indicated that *R. quelen* is formed by different MOTUs and suggest that occurs an interchange of individuals coming from distinct molecular units belong to different analyzed cultivation sites and high genetic diversity. The molecular markers used in this study has proved to be efficient for definition of genetic groups, and this enables that analyzed cultures from the obtained results in this study start to develop genetic breeding programs. This paper suggests that restocking programs with fishes coming from commercial cultivations does not be done.

Key-words: Mitochondrial DNA, Nuclear DNA, MOTUs, Aquaculture.

RESUMO

O gênero *Rhamdia* é composto por espécies morfológicamente semelhantes e com ampla distribuição geográfica. O jundiá *Rhamdia quelen* destaca-se entre elas, com grande participação na piscicultura do Sul do Brasil. Apesar de sua relevância para o cultivo, a identificação atualmente é incerta, e comercialização é feita normalmente pela denominação jundiá. A caracterização genética através do DNA *barcode* e de marcadores microssatélites é de grande importância para o crescimento da piscicultura continental. O presente estudo teve como objetivo utilizar o gene COI para investigar o número de unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTUs), definir o ótimo *threshold* (OT) a partir do conjunto de dados analisados, e determinar a diversidade e a estrutura genética através de marcadores microssatélites. Para análise do gene COI foram utilizadas 85 indivíduos oriundos de cultivos comerciais de Santa Catarina (SC), Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS), selvagens do rio Uruguai além de sequências referência do BOLD. Três MOTUs foram definidas a partir do OT (1,73%). O número de clados obtidos pela árvore NJK2P corroborou com o número de MOTUs obtidas. As análises dos marcadores microssatélites foram realizadas com 90 indivíduos de jundiá de cultivos comerciais e selvagens do sul do Brasil. As análises de estrutura genética populacional suportam existência de três unidades genéticas distintas, sendo uma formada por indivíduos provenientes de cultivos dos estados de SC e PR, outra de indivíduos oriundos do rio Uruguai, e uma terceira de indivíduos de cultivo oriundas do RS. A análise bayesiana indicou que alguns indivíduos analisados representam o resultado cruzamentos entre indivíduos de distintas unidades genéticas. Os resultados indicaram que *R. quelen* é formada por diferentes MOTUs, sugerem que ocorre intercâmbio de indivíduos correspondentes às distintas unidades moleculares dos diferentes locais de cultivo analisados e alta diversidade genética. Os marcadores moleculares utilizados neste estudo se mostraram eficientes para definição de grupos genéticos, o que possibilita que os cultivos analisados a partir dos resultados obtidos neste estudo comecem a desenvolver programas de melhoramento genético. Este trabalho sugere que não sejam feitos programas de repovoamentos com peixes oriundos de cultivos comerciais.

Palavras-chaves: DNA Mitocondrial, DNA Nuclear, MOTUs, Aquicultura.

INTRODUÇÃO

Popularmente conhecido como jundiá, a espécie *Rhamdia quelen* é um tipo de bagre com ampla distribuição na região Neotropical e habita diversos ambientes aquáticos, incluindo rios, riachos, e lagoas (BOCKMANN;GUAZZELLI, 2003). Encontra-se entre as espécies mais cultivadas por piscicultores da região Sul do Brasil, por apresentar diversas características de interesse zootécnico (ZANIBONI-FILHO, 2004; SEBRAE, 2015). Em uma revisão taxonômica do gênero *Rhamdia* realizada em 1996 por Silfvergrip, cerca de 100 espécies descritas foram agrupadas em apenas 11 espécies válidas (detalhes ver REIS et al., 2003). Segundo essa revisão proposta, *R. quelen* apresenta 49 espécies consideradas sinônimas, dentre elas *Rhamdia branneri* Haseman 1911 e *Rhamdia voulezi* Haseman 1911. Contudo alguns trabalhos contestam a tese de Silfvergrip, estudo de Abucarma; Martins-Santos (2001) realizado na bacia do Rio Iguaçu com as espécies *R. branneri*, *R. voulezi* e *Rhamdia* sp., onde os autores apontam que as espécies estudadas apresentam características distintas relacionadas ao cariótipo. Baumgartner et al. (2012) publicaram uma chave de identificação para peixes do baixo rio Iguaçu, na qual descrevem *R. branneri*, *R. voulezi* como espécies distintas, que foram recentemente confirmadas como espécies válidas através da metodologia de DNA *barcode* (RIBOLLI et al., 2017). Questões envolvendo relações entre espécies, indivíduos e populações podem ser estudados e melhor interpretados através de metodologias de biologia molecular, como a comparação de partes do genoma de espécies (AVISE, 2004).

Buscando elucidar problemas taxonômicos, diagnosticar possíveis equívocos e facilitar a identificação das espécies, Hebert et al. (2003) desenvolveram a técnica do DNA *barcode*. Essa metodologia é uma ferramenta de identificação amplamente aceita que se propõe a realizar uma descrição da biodiversidade global, utilizando uma porção gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) para grupos animais. A metodologia pode ser utilizada a partir de DNA obtido de indivíduos em todos os estágios de vida dos espécimes (ovos a adultos) e pequenos fragmentos amostrais (STOECKLE, 2003), bem como seus produtos (filés, enlatados) na detecção de fraudes ou substituição de espécies em transações comerciais (SMITH et al., 2008). Além disso, quando associado a recurso de bioinformática têm sido utilizado para agrupar e delimitar *clusters* de sequências (que atuam como representantes dos genomas dos quais são derivados) em unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTU) (FLOYD et al., 2002;

BLAXTER; FLOYD 2003; JONES et al., 2011). A delimitação de MOTUs é utilizada como um complemento às limitações da sistemática convencional para a identificação taxonômica em diversos estudos de biodiversidade, pois permite identificações rápidas e eficientes de organismos que são difíceis de estudar morfologicamente (FLOYD et al., 2002; BLAXTER, 2006; KNOX et al., 2012; CIVADE et al., 2016).

No contexto de estudos populacionais, marcadores moleculares são os mais adequados para investigar relações entre indivíduos dentro e entre populações. Os marcadores microssatélites apresentam altas taxas de mutação e alto polimorfismo, características que são importantes para a utilização em genética animal, não somente na identificação individual e na determinação de parentesco, mas também por poderem ser empregados em programas de melhoramento animal (FERGUSON et al., 1995; MELO et al., 2008).

O problema taxonômico do gênero *Rhamdia* é conhecido e já foi evidenciado por alguns trabalhos científicos (BALDISSEROTTO RADÜNZ NETO, 2004; BAUMGARTNER et al., 2012; GARAVELHO; SHIBATTA, 2016; RIBOLLI et al., 2017) contudo, paralelamente a esses questionamentos ocorre o crescimento do seu cultivo, principalmente na região Sul do Brasil.

O presente trabalho objetivou inferir o número de MOTUs, a diversidade e a estrutura genética de *Rhamdia quelen* oriundos de estações de cultivo da região Sul do Brasil e de indivíduos selvagens provenientes da bacia do Alto e Médio Rio Uruguai, por meio do DNA *barcode* e marcadores microssatélites para verificar a quantidade de unidades genéticas que estão sendo cultivadas no Sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e extração de DNA

Foram coletadas e conservadas amostras de nadadeiras de 93 indivíduos de *R. quelen* identificados com o nome comum “jundiá”, de diferentes estações de pisciculturas comerciais dos estados de Santa Catarina (SC): comercial Gaspar (n=14); comercial Camboriú (n=7); comercial Canoinhas (n=6) e comercial Caçador (n=7), Rio Grande do Sul (RS): comercial Santa Maria (n=10), e do Paraná (PR): comercial Toledo (n=10), além de peixes oriundos da bacia do Rio Uruguai: selvagem Alto rio Uruguai (n=16) e Médio rio Uruguai (n=23). O DNA foi extraído seguindo o protocolo proposto por Aljanabi; Martinez (1997), com algumas modificações.

Amplificação dos fragmentos de DNA *barcode* (gene COI) e Análise de Dados

A amplificação da região 5' do gene COI, foi realizada 77 indivíduos utilizando um conjunto de *primers* descritos por Ward et al. (2005), FishF1 e FishR1. A reação para amplificação seguiu o protocolo proposto por Bellafronte et al. (2013). Os segmentos de DNA amplificados foram verificados em gel de agarose 1%. Os produtos obtidos foram purificados com reagente contendo 20% de PEG8000 (Polietilenoglicol 8000) em solução de NaCl 2,5 M, segundo protocolo descrito por Lis; Schleif (1975). Após purificados, os produtos de PCR foram submetidos a uma nova amplificação utilizando o kit de sequenciamento comercial Big Dye Terminators v3. O produto gerado pela segunda amplificação foi precipitado com etanol, acetato/EDTA. O sequenciamento foi realizado no equipamento Applied Biosystems 3500xLe os eletroferogramas visualizados por meio do software Sequencing Analysis v5.3.1. As sequências obtidas foram alinhadas e editadas através da ferramenta Clustal W, no programa BioEdit v7.2.5 (HALL, 1999), combinadas com as sequências COI de referência das espécies do gênero *Rhamdia* disponíveis no banco de dados da BOLD: *R. quelen* (n = 6) (código: FARG317-07; FARGB235-11; FARGB236-11; FPSR094-09; FPSR095-09; FPSR096-09), e sequências utilizadas como grupo externo: *R. guatemalensis* (código: EU751962.1) e *Pimelodella* sp. (código: HM376392.1), totalizando 85 sequências. Este estudo também gerou uma árvore filogenética NJK2P a partir de 29 sequências COI obtidas no BOLD sendo 24 depositadas como *R. quelen*, quatro *R. guatemalensis* e uma como grupo externo de *Pimelodella* sp.

O programa computacional MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) foi utilizado para gerar a análise de distância de *Neighbor-Joining* (NJ). As análises foram geradas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) e com taxas de variação uniformes entre os sítios, este modelo assume taxas diferentes entre transições (A-G, C-T) e transversões (A-C, A-T, C-G, G-T). O suporte dos cladogramas foram avaliados com 10.000 replicações de *bootstrap*. O pacote SPIDER (*SPecies IDentity and Evolution in R*; BROWN et al., 2012), analisado na plataforma R (<http://www.R-project.org>) foi utilizado inicialmente para calcular a mínima distância interespecífica, ótimo *threshold* (OT), a fim de definir as Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs). O OT foi calculado utilizando a função *localMinima* e sem o conhecimento *a priori* sobre a identidade dos indivíduos. O programa computacional

jMOTU (JONES et al., 2011) foi utilizado para calcular o número de MOTUs.

Amplificação dos Marcadores Moleculares Microsatélites (SSR) e Análise dos Dados

A amplificação dos microsatélites foi realizada por meio de PCR de 90 indivíduos, utilizando um conjunto de sete loci de microsatélites específicos para *R. quelen* (Rhq2, Rhq7, Rhq13, Rhq15, Rhq20, Rhq26, Rhq28; RÍOS et al., 2013). As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 12 µl, contendo 2,0 µl de DNA (50 ng), 1,4 µl de tampão 10x (1x), 0,6 µl de dNTPs (0,2mM), 0,4 µl de MgCl₂ (2Mm), 0,2 µl de cada *primer* (5 pmol), 0,2 µl de *Taq polimerase* (1 unidade) e 7,0 µl de água Milli-Q. Os produtos amplificados foram diluídos a uma proporção de 1:10 ou 1:15 (produto PCR: Água Milli-Q). Posteriormente, misturou-se 1 µl do produto diluído, 8,75 µl de formamida e 0,25 µl de GeneScan 600 Liz Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram genotipados em sequenciador automático Applied Biosystems 3500xL. Para análise de presença de estrutura populacional foi utilizado o programa computacional Structure 2.3. A diversidade genética dos grupos amostrais foi determinada através dos programas Fstat e Genalex 6.5.

RESULTADOS

O problema taxonômico do gênero *Rhamdia* já foi evidenciado por alguns trabalhos científicos (BAUMGARTNER et al., 2012; GARAVELHO; SHIBATTA, 2016; RIBOLLI et al., 2017) contudo, paralelamente a esses questionamentos ocorre o crescimento do seu cultivo, principalmente na região Sul do Brasil. Com base em dados de 24 sequências parciais do gene COI de indivíduos denominados como *R. quelen* disponíveis no banco de dados BOLD, foi possível gerar uma análise filogenética para demonstrar a complexidade atual da espécie. A árvore revelou quatro agrupamentos distintos (Figura 1), com valores de divergência entre os indivíduos de *R. quelen* dos diferentes locais de origem variando de 2,83% (rio São Francisco x rio Paraíba do Sul) a 4,81% (rio São Francisco x rio Itapecuru). Foram feitas ainda as comparações par-a-par entre todas as sequências de *R. quelen* existentes no BOLD, sendo obtido o valor de distância mínima de 0%, distância média de 2,63% e distância máxima de 7,90%.

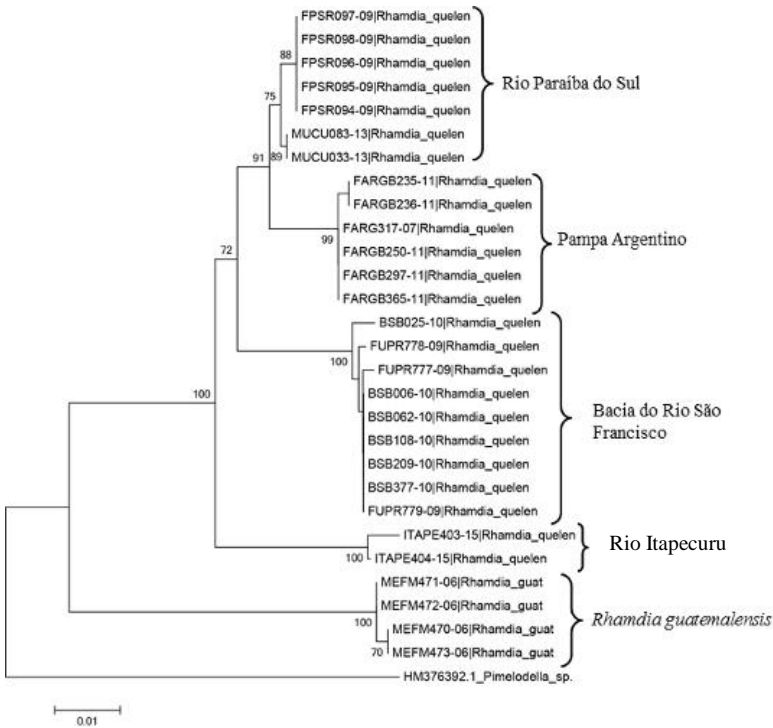


Figura 1: Árvore filogenética NJK2P gerada a partir de seqüências COI obtidas no BOLD para indivíduos de *Rhamdia quelen*, e dos grupos externos (*R. guatemalensis* e *Pimelodella* sp.). Origem das seqüências (FPSR e MUCU: Paraíba do Sul; FARGB: Pampa Argentino; BSB: Santana do Riacho, rio São Francisco; FUPR: Rio São Francisco; ITAPE: Rio Itapecuru, Nordeste brasileiro; MEFM: México; HM: *Pimelidella* sp.).

DNA Barcode

Foram obtidas 77 seqüências consenso a partir do alinhamento de *forward* e *reverse* para o gene COI. O alinhamento gerado apresentou 652 sítios, sendo 529 conservados, 123 variáveis, totalizando 53 sítios parcimoniosamente informativos (seqüências com sítios variáveis informativos podem ser visualizadas no apêndice IV). Adicionalmente foram utilizadas seqüências referencias de espécies obtidas no BOLD, seis seqüências de *R. quelen*, duas como grupo externo (*R. guatemalensis* e *Pimelodella* sp.), totalizando 85 seqüências. O OT calculado (considerando todas as 85 seqüências) foi de 1,73%,

permitindo identificar três MOTUs referentes a *R. quelen* e duas correspondentes aos grupos externos (Apêndice V). As distâncias genéticas entre as 77 sequências oriundas do estudo geraram 2.927 comparações para-a-par entre os indivíduos, com valores de distância mínima de 0%, média de 2,20%, e distância máxima de 5,14%.

O número de MOTUs obtidos foi congruente com os resultados obtidos na árvore filogenética de NJK2P, permitindo assim utilizar esta estimativa como valor de corte para determinar os distintos MOTUs na árvore filogenética (Figura 1 e 2). A MOTU 1 foi formada quase que exclusivamente por indivíduos oriundos dos cultivos comerciais, a MOTU 2 foi composta por indivíduos selvagens originários do Médio rio Uruguai e do Alto rio Uruguai, e a MOTU 3 foi composta exclusivamente por peixes oriundos do cultivo comercial de Toledo (PR).



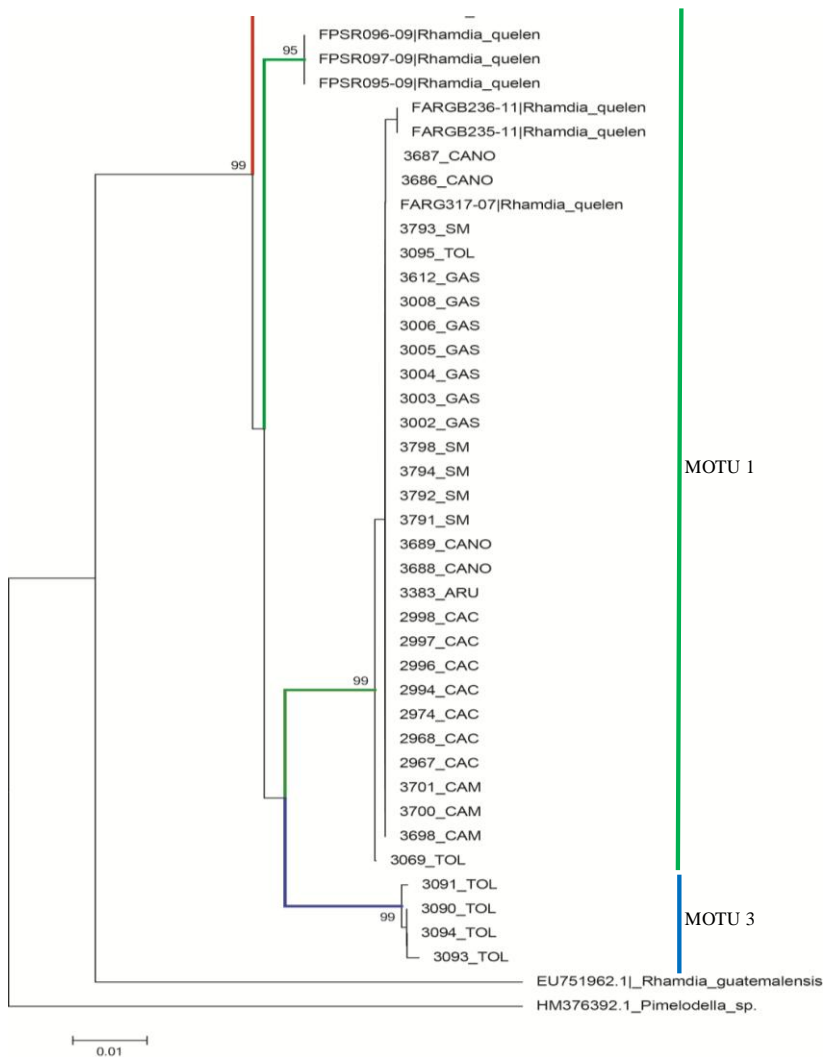


Figura 2: Arvore filogenética de NJK2P mostrando o agrupamento das linhagens pela distância, gerada no programa MEGA a partir de seqüências de *R. quelen*, *R. guatemalensis* e *Pimelodella* sp., do gene COI. Linhas Verde: MOTU 1, Vermelha: MOTU 2, Azul: MOTU 3. Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM).

Para *R. quelen*, os valores inter-MOTU variaram de 3,07% (MOTU 3 x MOTU 1) a 4,26% (MOTU 2 x MOTU 3) e intra-MOTUs de 0,15% (MOTU3) a 0,40% (MOTU1),(Tabela 2).

Tabela 2 Distâncias intra-MOTU (em negrito) e inter-MOTU, de *R. quelen* com base no agrupamento gerado pela árvore de NJK2P e pelas análises no jMOTU. Distâncias geradas no programa MEGA para gene COI das 85 sequências analisadas.

MOTUs	MOTU1	MOTU 2	MOTU3	<i>R. guatemalensis</i>
MOTU1	0,40			
MOTU2	3,94	0,18		
MOTU3	3,07	4,26	0,15	
<i>R. guatemalensis</i>	9,80	9,81	9,41	
<i>Pimellodela sp</i>	11,42	12,65	12,71	13,87

Análises da diversidade e estrutura genética através de Marcadores Microssatélites

Os resultados da diversidade genética para os grupos amostrais estão apresentados resumidamente na tabela 3 (detalhadamente para todos os loci apêndice V). O número de alelos (N_A) variou de 6 (CANO e CAC) a 13 (MRU), com total de 69 alelos (média de 8,6 alelos por loco). A heterozigiosidade esperada (H_E) variou de 0,75 (CANO) a 0,85 (MRU), com valor médio de 0,81. A heterozigiosidade observada (H_O) variou de 0,59 (TOL) a 0,87 (GAS), com média geral de 0,73. A riqueza alélica (R_A) e a diversidade gênica (D_G) apresentaram média de 5,97 alelos e 0,86, respectivamente. Quando analisados individualmente, somente o locus Rh20 apresentou déficit de heterozigotos (valores negativos e significativos de F_{IS}) para os indivíduos dos grupos amostrais ARU e MRU (Apêndice VI). Contudo, quando os loci foram analisados resumidamente, apenas indivíduos do grupo amostral GAS apresentaram excesso de heterozigotos (em negrito na Tabela 3) Todos os grupos amostrais apresentaram uma alta diversidade genética, sendo os grupos amostrais de MRU e ARU composto de indivíduos selvagens com maiores valores de diversidade e heterozigiosidade esperada.

Tabela 3: Caracterização dos oito grupos amostrais de *R. quelen*, número de indivíduos (N); número de alelos (N_A); riqueza alélica (R_A); diversidade gênica (D_G), heterozigosidade observada (H_O); heterozigosidade esperada (H_E); coeficiente de endocruzamento (F_{IS}); probabilidade de déficit de heterozigotos (P_L); probabilidade de excesso de heterozigoto (P_S). Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM).

Grupo Amostral	N	N_A	R_A	D_G	H_O	H_E	F_{IS}	P_L	P_S
ARU	15	13	6,70	0,88	0,69	0,84	0,21	1,000	0,001
CAC	6	6	6,00	0,89	0,76	0,80	0,15	0,996	0,011
CANO	6	6	5,43	0,84	0,70	0,75	0,16	0,991	0,011
CAM	7	7	6,13	0,88	0,80	0,81	0,10	0,978	0,071
GAS	12	8	5,46	0,81	0,87	0,78	-0,07	0,087	0,960
SM	10	8	5,66	0,85	0,70	0,80	0,18	1,000	0,001
TOL	10	8	6,03	0,87	0,59	0,81	0,32	1,000	0,001
MRU	23	13	6,34	0,88	0,70	0,85	0,20	1,000	0,001
Média		8,63	5,97	0,86	0,73	0,81	0,16	0,881	0,132

P=nível nominal indicativo ajustado (5%) comparações par-a-par P=0,001

Inicialmente realizamos uma análise de atribuição bayesiana, sem informação *a priori*, que indicou a existência de três grupos genéticos ($K=3$). Os resultados das estimativas de $L(K)$ e Delta K podem ser visualizados nas Figuras 3-A e 3-B. A representação gráfica da estrutura populacional também é apresentada para $K=3$ (Figuras 4).

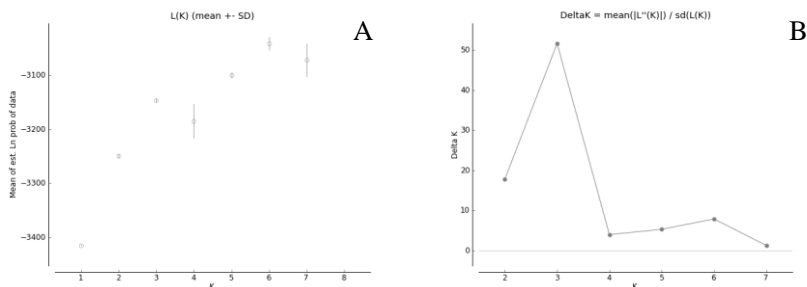


Figura 3: Gráfico de $L(K)$ (A) e Delta K (B) para *R. quelen*, obtidos através da análise de atribuição bayesiana do programa Structure sem informação *a priori* da origem dos indivíduos. A representação gráfica foi obtida através do programa Structure Harvester.

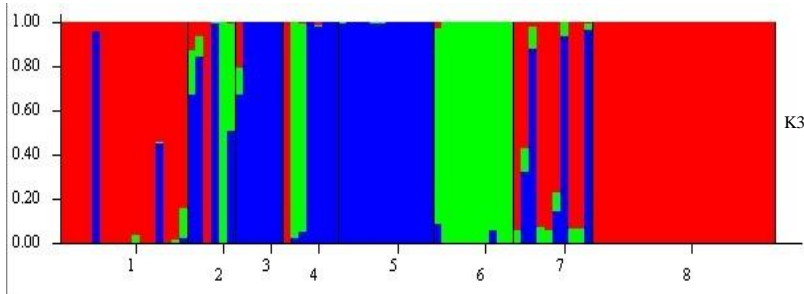


Figura 4: Resultados do agrupamento para $K=3$ de *R. quelen* obtido através da análise bayesiana no programa Structure. Os indivíduos são representados como colunas e as linhas pretas delimitam os grupos amostrais. Números laterais indicam a proporção genética pertencente a cada agrupamento. ARU=1, CAC=2, CANO=3, CAM=4, GAS=5, SM=6, TOL=7 e MRU=8.

No gráfico de atribuição dos indivíduos ($K=3$) (Apêndice VII) foi possível observar os indivíduos que possuem maior probabilidade de pertencerem a um único grupamento genético, porém, indivíduos que estão representados por diferentes cores provavelmente pertencem a mais de um agrupamento definido pela análise Bayesiana (por exemplo o indivíduo 3383, que possui as cores azul e vermelho (Apêndice VII). Adicionalmente, a análise com marcadores microssatélites sugere possíveis cruzamentos genéticos entre indivíduos de diferentes MOTUs definidas pela análise filogenética.

A estimativa de diferenciação genética gerada pelo índice de fixação (F_{st}) também foi conduzida, a fim de verificar se os indivíduos dos diferentes grupos amostrais possuem estruturação genética significativa. Os valores de F_{st} e valores de p que são apresentadas na Tabela 4. Os indivíduos do grupo amostral MRU apresentaram diferença genética em relação a todos os demais os grupos amostrais avaliados.

Tabela 4: Diferenciação genética estimada pelo índice de fixação (F_{st}) dos grupos amostrais de *R. quelen*. Análises par-a-par através do programa Fstat, com valores de p acima da diagonal e de F_{st} abaixo. (Valores significativos de F_{st} estão apresentados em negrito). Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM).

Grupo Amostrai	ARU	CAC	CANO	CAM	GAS	SM	TOL	MRU
ARU	-	0,007	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002
CAC	0,03	-	0,055	0,396	0,005	0,002	0,016	0,002
CANO	0,08	0,04	-	0,005	0,004	0,002	0,002	0,002
CAM	0,03	-0,01	0,06	-	0,007	0,005	0,014	0,002
GAS	0,08	0,06	0,07	0,05	-	0,002	0,002	0,002
SM	0,09	0,05	0,08	0,07	0,11	-	0,002	0,002
TOL	0,06	0,04	0,08	0,04	0,10	0,06	-	0,002
MRU	0,03	0,04	0,08	0,05	0,10	0,09	0,06	-

P=nível nominal indicativo ajustado (5%) comparações par-a-par P=0,002.

Os resultados da análise filogenética foram congruentes para ambos os marcadores genéticos utilizados para a maioria dos indivíduos, revelando a existência de três grupos genéticos distintos como pode ser observado no (Apêndice VIII).

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados das sequências parciais do gene COI de indivíduos denominados como *Rhamdia quelen* disponíveis no banco de dados BOLD, apresentaram divergência intraespecífica entre as diferentes localidades superiores àqueles considerados como padrão para valor de corte para delimitação de espécies de peixes Neotropicais, cujo valor considerado é de 2% (PEREIRA et al., 2013). Com esse levantamento fica evidente a necessidade do reconhecimento das unidades genéticas de jundiá que estão sendo cultivadas e comercializadas na região Sul do Brasil, cujo desconhecimento e a falta de controle podem acarretar na contaminação de estoques naturais, além de ir contra as práticas de melhoramento genético desejado para a espécie.

Ambas as metodologias de DNA *barcode* e marcadores microssatélites identificaram estruturação genética entre os indivíduos de *R. quelen* analisados. O DNA *barcode* revelou a existência de três MOTUs a partir do OT. O valor calculado no presente estudo foi similar ao valor sugerido, de 2%, para distinguir espécies de peixes

Neotropicais (PEREIRA et al., 2013). A árvore filogenética gerada pela metodologia de NJK2P também revelaram a formação de três clados principais, corroborando com o número de MOTUs estimado através do software jMOTU.

A árvore filogenética mostrou uma complexa mistura dos indivíduos oriundos dos diferentes locais amostrados, principalmente dentre aqueles provenientes de unidades de estações de cultivo. Deste modo, as distâncias genéticas tanto interespecíficas como intraespecíficas foram realizadas de acordo com as MOTUs identificadas (valores inter e intra-MOTUs). A maioria das unidades de cultivos comerciais forma seus planteis de reprodutores a partir de indivíduos provenientes de diversos locais de origem, tanto selvagens quanto provenientes de outras pisciculturas, favorecendo assim o intercâmbio genético dos peixes mantidos nas distintas unidades de cultivo (HASHIMOTO et al., 2012; HASHIMOTO et al., 2016).

As distâncias inter-MOTU entre os agrupamentos de *R. quelen* foram superiores aos valores intra-MOTU, essa característica, também conhecida como *barcoding gap*, é esperada para indivíduos da mesma espécie, pois as distâncias interespecíficas, ou seja, entre os agrupamentos, tendem a ser maiores do que as distâncias intraespecíficas (HEBERT et al., 2004; SMITH et al., 2006; PEREIRA et al., 2013). De acordo com a literatura, os primeiros trabalhos com DNA *barcode* utilizavam um valor teórico como *threshold* para identificação de espécies. Ward; Hanner (2009) sugeriam o valor de distância intraespecífica mínima de 3,5% como o valor para delimitação de espécies de peixes. Contudo, para a grande maioria das espécies de peixes Neotropicais avaliadas através do DNA *barcode*, divergências genéticas maiores que 2% ou 3% foram utilizadas para a delimitação de espécies (LARA et al., 2010; ANTUNES et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; RAMIREZ; GALETTI Jr, 2015). Entretanto, devido à grande diversidade e características de cada uma das espécies, além da variação dos ambientes que habitam, o emprego de um valor fixo pode subestimar ou superestimar o número adequado de MOTUs (BROWN et al., 2012). Os valores inter-MOTU acima de 3% para *R. quelen* são superiores ao OT calculado e aos valores sugeridos pela literatura.

A inferência das distâncias genéticas presentes em indivíduos oriundos tanto em cultivos comerciais quanto experimentais permite avaliar a estrutura populacional, podendo prover diretrizes para estratégias de conservação e manejo genético em programas de piscicultura (WASKO; GALETTI JUNIOR, 2002).

Os resultados obtidos nas análises dos marcadores microsstatélites suportam existência de três unidades genéticas distintas, sendo uma de indivíduos provenientes de cultivos dos estados de Santa Catarina e Toledo (PR), uma segunda de indivíduos selvagens do rio Uruguai e outra de indivíduos de Santa Maria (RS). A análise bayesiana indicou que alguns indivíduos analisados representam o resultado da “mistura” genética entre distintas unidades, como consequência do cruzamento de indivíduos correspondentes à distintas unidades moleculares e dos diferentes locais de cultivo analisados. Os indivíduos provenientes de cultivo apresentaram uma elevada variabilidade e diversidade genética, além de uma heterozigiosidade esperada elevada, esses resultados ocorrem devido ao fato de que a grande maioria os plantéis de reprodutores são formados por exemplares oriundos de outras pisciculturas (HASHIMOTO et al., 2012; HASHIMOTO et al., 2016). O grupo amostral de Gaspar apresentou excesso de indivíduos heterozigotos uma explicação para este resultado pode ser devido ao cruzamento de indivíduos pertencentes a distintas MOTUs, ou até mesmo o cruzamentos inter-específicos, uma vez que a caracterização as espécies que compõem o gênero *Rhamdia* ainda é complexa.

Dentre todos os grupos amostrais de *R. quelen* analisados, somente os indivíduos provenientes do Médio rio Uruguai não revelaram indícios de estruturação populacional ou material genético de outros grupos amostrais. Isso ocorre porque os indivíduos deste grupo amostral não apresentam contaminação genética com peixes de cultivo, em contrapartida, os indivíduos oriundos da região do Alto rio Uruguai apresentaram evidências de composição genética de peixes de origem comercial, uma vez que esta região sobre maior impacto de pisciculturas comerciais (SCHORK et al., 2012; SILVA, 2014). Os indivíduos que pertencem a mais de um agrupamento definido pela análise Bayesiana representam indivíduos de diferentes MOTUs. Os valores de diversidade genética, observados para a quantidade de alelos e a heterozigiosidade observada, foram semelhantes àqueles e encontrados na literatura para peixes de água doce (DE WOODY; AVISE, 2000; SANCHES; GALETTI Jr, 2006; NUNES, 2010; RIBOLLI et al., 2015). Os grupos amostrais do alto e médio rio Uruguai apresentaram maiores valores de riqueza alélica e heterozigiosidade esperada em relação os outros grupos amostrais derivados de cultivos, estes parâmetros são componentes da medida de diversidade genética, que fornece subsídios para a escolha de quais grupos genéticos serão priorizados nos programas de melhoramento (PETIT et al., 1998; LOPES et al., 2009). A variabilidade genética é fundamental para a implantação de programas de

melhoramento genético (FALCONER, 1987; LOPES et al., 2009; HASHIMOTO et al., 2012), que consiste em priorizar o cruzamento de indivíduos geneticamente superiores para determinadas características zootécnicas de interesse como: crescimento rápido, melhores índices de conversão alimentar e resistência à doenças (MELO et al., 2006; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2013). Para que haja a aquisição desses caracteres desejados, busca-se o aumento da frequência dos alelos favoráveis e redução dos alelos desfavoráveis (RESENDE et al., 2010). Segundo Frost; Evans; Jerry (2006) a diminuição da variabilidade genética em estoques de pisciculturas ocorre principalmente por manejo reprodutivo inadequado e seleção não intencional.

Os potenciais usos dos marcadores genéticos já vêm sendo estudados há décadas, de acordo com Hedgecock (1977), podem ser utilizados para resolver uma série de problemas encontrados no desenvolvimento de reprodutores, podendo marcar ou identificar indivíduos, populações, unidades populacionais ou espécies. Vanhaecke et al. (2012) utilizaram com sucesso marcadores moleculares para delimitação de espécies e a identificação de híbridos de *Aplochiton zebra* e *Aplochiton taeniatus*. Os marcadores microssatélites permitiram a discriminação entre as diferentes populações, que neste caso são chamadas de unidades genéticas, além de detectar indivíduos que possuem o genoma compartilhado, informação esta que não seria possível obter apenas através do DNA mitocondrial (VANHAECKE et al. 2012). A hibridização natural é relativamente frequente mesmo ocorrendo em baixas taxas (ARNOLD; MEYER, 2006), podendo desempenhar um papel importante na evolução das espécies (SALZBURGER; BARIC; STURMBAUER, 2002). Contudo, estressores antropogênicos, como degradação ambiental ou introdução de espécies exóticas, têm aumentado as taxas de hibridização, embora os mecanismos possam ser sutis (VANHAECKE et al., 2012). Hashimoto (2011) relata que a fertilidade de híbridos devem ser discutidas, uma vez que impactam negativamente nas populações naturais, pois são utilizadas como matrizes, podendo causar prejuízos financeiros aos próprios produtores. O escape de híbridos produzidos pela piscicultura tem causado contaminação genética e ameaçado a integridade genética das populações naturais e cultivadas (VAINI et al., 2016)

A identificação genética de peixes e seus produtos é uma ferramenta de grande importância tanto na conservação dos estoques naturais quanto na detecção de fraudes (CARVALHO et al., 2008), além de ser uma importante ferramenta em programas de melhoramento

genético e na identificação das unidades genéticas que estão sendo cultivadas. A técnica do DNA *barcode* é uma ferramenta que têm se mostrado eficiente no auxílio para a identificação genética de espécies crípticas e complexas, como o caso da espécie alvo deste estudo, o jundiá *R. quelen*. A análise e a identificação das espécies pertencentes ao gênero *Rhamdia* é complexa devido à grande similaridade morfológica entre elas e à ampla distribuição geográfica. Pereira et al. (2013) realizaram estudo que corroborou a eficiência do uso da técnica de DNA *barcode* em peixes Neotropicais, tendo sido eficaz na discriminação de 99,2% das espécies avaliadas. Hashimoto et al. (2016) relatam que o uso destes marcadores é essencial no manejo adequado em pisciculturas, pois auxiliam no monitoramento da produção e no controle do comércio de híbridos interespecíficos, além de serem uma excelente alternativa para a tradicional identificação morfológica de peixes. O presente estudo demonstra o grande potencial da associação do uso de marcadores genéticos (DNA *barcode* e microssatélites) para caracterização genética de cultivos comerciais e de estoques naturais de peixes de água doce, além de demonstrar a complexidade na caracterização da espécie.

A classificação taxonômica atual de *R. quelen* é confusa e complexa devido a grande similaridade entre as características morfológicas, sendo de difícil identificação e com isso gerando grande controvérsia taxonômica, o que dificulta o desenvolvimento de programas de melhoramento genético tanto em cultivos comerciais quanto acadêmicos. Na busca para elucidar a complexa caracterização do gênero *Abucarma*; Martins-Santos (2001) realizaram pesquisa na bacia do Rio Iguaçu com as espécies *R. branneri*, *R. voulezi* e *Rhamdia* sp., onde apontaram que as espécies estudadas apresentam características distintas relacionadas ao cariótipo. Baumgartner et al. (2012) publicaram uma chave de identificação para peixes do baixo rio Iguaçu, na qual descrevem *R. branneri*, *R. voulezi* como espécies distintas, que foram recentemente confirmadas como espécies válidas através da metodologia de DNA *barcode* (Ribolli et al., 2017). Os marcadores moleculares utilizados neste estudo se mostraram eficientes para definição de MOTUs, o que possibilita que os cultivos analisados a partir dos resultados obtidos sejam passíveis de começarem a desenvolver programas de melhoramento.

Necessariamente novos estudos devem ser desenvolvidos para delimitar as espécies do gênero *Rhamdia*, através de estudos interdisciplinares envolvendo a biologia molecular e da taxonomia tradicional. O número de indivíduos que atualmente são considerados

como *R. quelen*, podem formar um "complexo de espécies". Posteriormente a essa delimitação, será possível investigar a ocorrência de hibridações não intencionais ocasionadas em decorrência programas de pisciculturas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior), ao CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a FAPESC (Fundação de Amparo á Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina). Ao LAPAD (Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce) do, Departamento de Aquicultura, UFSC, SC. Ao LFDGV/UFSC (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal), pela cessão da infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Abucarma, M. , Martins-Santos, I. (2001). Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguacu Basin. *Cytologia*, 66(3), 299-306.
- Aljanabi, S.M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Oxford Journals: Nucleic Acids Research*, 4692-4693.
- Antunes, R.S.P. Gomes, V.N., Bignotto, T.S., Maniglia, T.C., Prioli, S.M.A.P., Prioli, A.J. (2011). Utilização Do Gene Mitocondrial Citocromo C Oxidase I Para Distinguir duas Espécies de *Zungaro* (Siluriformes: Pimelodidae) De Duas Bacias Neotropicais. In: X CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, São Lourenço. Sociedade de Ecologia do Brasil. São. [online] Disponível em <http://www.seb-ecologia.org.br/xceb/r> [Acesso em: 22 Jan. 2017].
- Arnold, M., Meyer, A. (2006). Natural hybridization in primates: One evolutionary mechanism. *Zoology*, 109(4), 261-276.
- Avise, J. (2004). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 1st ed. Boston, MA: Springer US.

Baldisserotto, B. (2004). Criação de Jundiá. 1st ed. Santa Maria: Ed. UFSM.

Barroso, A. da S., Silva, L. R.; Barros, V. M., Oliveira, A. da S., Alves, M. S. S.; Varela, E. S., Hashimoto, D. T., Alves, A. L. (2013). Implantação do banco de DNA de peixes da Bacia Araguaia-Tocantins: aplicações na taxonomia, produção. *Revista Integralização Universitária* . 7, 173-180.

Baumgartner, G. (2012). *Peixes do baixo Rio Iguaçu*. 1st ed. Maringá: EDUEM.

Bellafronte, E., Mariguela, T., Pereira, L., Oliveira, C., Moreira-Filho, O. (2013). DNA *barcode* of *Parodontidae* species from the La Plata river basin - applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotropical Ichthyology*, 11(3), 497-506.

Blaxter, M., Floyd, R. (2003). Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(6), 268-269.

Blaxter, M. (2006). Will DNA barcoding advance efforts to conserve biodiversity more efficiently than traditional taxonomic methods?. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(5), 268-273.

Bockmann, F., Guazzelli, G. (2003). *Family Heptapteridae (Heptapteridae)*, 406-431. In: Reis, R., Kullander, S., Ferraris J.R. C. (Eds). *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 729.

Brown, S., Collins, R., Boyer, S., Lefort, M., Malumbres-Olarte, J., Vink, C., Cruickshank, R. (2012). Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 562-565.

Carvalho, D.C., Seerig, A.; Melo, D.C., Sousa, A.B., Pimenta, D., Oliveira, D.A.A. (2008). Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). *Revista Brasileira De Reprodução Animal*, 32(4), 215-219.

Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J., Bonin, A., Taberlet, P., Pont, D. (2016). Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. *PLOS ONE*, 11(6), e0157366.

DeWoody, J., Avise, J. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56(3), 461-473.

Falconer, D.S. (1987). Introdução a genética quantitativa. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa.

Ferguson, A., Taggart, J., Prodohl, P., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P., Hynes, R. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, 47(sa), 103-126.

Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11(4), 839-850.

Frost, L., Evans, B., Jerry, D. (2006). Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 261(3), 1056-1064.

Garavello, J., Shibatta, O. (2016). Reappraisal of *Rhamdia branneri* Haseman, 1911 and *R. voulezi* Haseman, 1911 (Siluriformes: Heptapteridae) from the rio Iguaçú with notes on their morphometry and karyotype. *Neotropical Ichthyology*, 14(1).

Garcia, C., Oliveira, C., Almeida-Toledo, L. (2010). Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 365-384.

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

Hashimoto, D., Mendonça, F., Senhorini, J., de Oliveira, C., Foresti, F., Porto-Foresti, F. (2011). Molecular diagnostic methods for identifying *Serrasalmid* fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. *Aquaculture*, 321(1-2), 49-53.

Hashimoto D. T., Alves A. L., Varela E. S., Moro G. V., Iwashita M. K. P. (2012b); Cartilha de Genética na Piscicultura : Importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA. *Embrapa*, 34.

Hashimoto, D.T., Prado, F., Senhorini, J., Foresti, F., Porto-Foresti, F. (2012). Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. *Aquaculture Research*, 44(6), 876-884.

Hashimoto, D., Prado, F., Foresti, F., Porto-Foresti, F. (2016). Molecular identification of intergenus crosses involving catfish hybrids: risks for aquaculture production. *Neotropical Ichthyology*, 14(2).

Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., deWaard, J. (2003). Biological identifications through DNA *barcodes*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Hebert, P., Penton, E., Burns, J., Janzen, D., Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817.

Hedgecock, D. (2009). Biochemical Genetic Markers For Broodstock Identification In Aquaculture I. *Proceedings of the annual meeting - World Mariculture Society*, 8(1-4), 523-531.

Jones, M., Ghoorah, A., Blaxter, M. (2011). jMOTU and Taxonator: Turning DNA *Barcode* Sequences into Annotated Operational Taxonomic Units. *PLoS ONE*, 6(4), e19259.

Knox, M., Hogg, I., Pilditch, C., Lörz, A., Hebert, P., Steinke, D. (2012). Mitochondrial DNA (COI) analyses reveal that amphipod diversity is associated with environmental heterogeneity in deep-sea habitats. *Molecular Ecology*, 21(19), 4885-4897.

Lara, A., Ponce de León, J., Rodríguez, R., Casane, D., Côté, G., Bernatchez, L., García-Machado, E. (2010). DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 421-430.

Lis, J., Schleif, R. (1975). The regulatory region of the l-arabinose operon: Its isolation on a 1000 base-pair fragment from DNA heteroduplexes. *Journal of Molecular Biology*, 95(3), 409-416.

Lopes, T., Streit Jr., D., Ribeiro, R., Povh, J., Lopera-Barrero, N., Vargas, L., Pinto Filho, C., Queiroz, J. (2009). Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 61(3), 728-735.

Melo, D.C., Olivera, D.A.; Ribeiro, L.P., Teixeira, C.S., Souza, A.B., Coelho, E.G.A.; Crepaldi, D.V., Teixeira, E.A. (2006). Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis sp.*) utilizando marcadores microssatélites. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58, 87-93.

Melo D.C., Oliveira D.A.A., Seerig, A.A., Carvalho D.C. (2008). Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificações de plantéis de tilápias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32, 214.

Mia, M., Taggart, J., Gilmour, A., Gheyas, A., Das, T., Kohinoor, A., Rahman, M., Sattar, M., Hussain, M., Mazid, M., Penman, D., McAndrew, B. (2005). Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. *Aquaculture*, 247(1-4), 267-273.

MMA. (Ministério do Meio Ambiente. (2009). Estratégia Nacional. [online] Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biosseguranca/especies-exoticas-invasoras/estrategia-nacional> [Acesso em: 22 Jan. 2017].

Moreira, A., Hilsdorf, A., Silva, J. , Souza, V. (2007). Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(4), 521-526.

Nascimento, M., Almeida, M., Veira, M., Limeira Filho, D., Lima, R., Barros, M., Fraga, E. (2016). DNA barcoding reveals high levels of genetic diversity in the fishes of the Itapecuru Basin in Maranhão, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 15(3).

Nunes, A.G. (2010) Variação genética em *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) na região do Alto Rio São Francisco, MG e contribuições para a conservação do grupo. São Carlos : UFSCar, 54.

Petit, R. J.; Mousadik, A.; Pons, A. O. (1998) Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*. Gainesville, v. 12, n. 4, p. 844-855.

Pereira, L., Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC Genetics*, 14(1), 20.

Ramirez, J., Galetti, P. (2015). DNA *barcode* and evolutionary relationship within *Laemolyta cope* 1872 (*Characiformes: Anostomidae*) through molecular analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 93, 77-82.

Reis, R., Kullander, S. , Ferraris, C. (2003). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. 1st ed. Porto Alegre, Brasil: EDIPUCRS.

Resende, E. K. de; Oliveira, C. A. L. de; Legat, A. P.; Ribeiro, R. P. (2010). Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010,. Maringá. Maringá: UEM.

Ribolli, J., Miño, C., Zaniboni-Filho, E., de Souza Guerreiro, T., Reynalte-Tataje, D., de Freitas, P. , Galetti, P. (2015). Preliminary insights into the genetic mating system of Neotropical *Salminus brasiliensis*: kinship assignment and parental reconstruction reveal polygynandry. *Ichthyological Research*, 63(1), 187-191.

Ribolli, J., Scaranto, B.M.S., Shibatta, O.A., Bombardelli. R.A., Zaniboni-Filho, E. (2017). DNA barcoding confirms the occurrence of *Rhamdia branneri* and *Rhamdia voulezi* (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguaçú River Basin. *Neotropical Ichthyology*, 15 (1), e160147.

Ríos N., Bouza C., Pardo B., Guerra-Varela J., Gutiérrez V., Martínez P., García G. (2013). Pyrosequencing for microsatellite discovery and validation of markers for population analysis in the non-model Neotropical catfish *Rhamdia quelen*. *Molecular Ecology Resources*, 13(3), 1-15.

Rocha, J. M., Cruz, R.C., Wenceslau, F.F. (2010). Avaliação ambiental Integrada: Uma experiência Interdisciplinar na bacia do rio Uruguai – Brasil In VI Seminário Latino-Americano de Geografia Física; II Seminário IberoAmericano de Geografia Física. Universidade de Coimbra. 1-13.

Rodriguez-Rodriguez, M., Lopera-Barrero, N., Vargas, L., Albuquerque, D., Goes, E., Prado, O. , Ribeiro, R. (2013). Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(10), 1385-1393.

Salzburger, W., Baric, S. , Sturmbauer, C. (2002). Speciation via introgressive hybridization in East African cichlids?. *Molecular Ecology*, 11(3), 619-625.

Sanches, A. , Galetti, P. (2006). Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 1045-1046.

Sebrae (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas) (2015). Aquicultura no Brasil. Brasília, p.71.

Schork, G., Hermes-Silva, S. , Beux, L.F., Zaniboni-Filho, E., Nuñez, A.P.O. (2012) Diagnóstico Da Pesca Artesanal Na Usina Hidrelétrica De Machadinho, Alto Rio Uruguai - Brasil. Boletim do Instituto de Pesca. São Paulo, 38(2): 97 – 108.

Silva, R. N. (2014). Diversidade espacial e temporal da ictiofauna do alto rio Uruguai: aliando técnicas de geoprocessamento. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Florianópolis. 48,

Smith, M., Woodley, N., Janzen, D., Hallwachs, W. , Hebert, P. (2006). DNA *barcodes* reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(10), 3657-3662.

Smith, P., McVeagh, S. , Steinke, D. (2008). DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology*, 72(2), 464-471.

Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*, 53(9), 796.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. , Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.

Vaini, J. O., do amaral C. B., Dos Santos Silva, D. B., Benites, C., Russo, M. R., Grisolia, A. B. (2016) Genetic variability of pure *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* individuals in the Paraná and Paraguay River basins. *Fisheries Science*, v. 82, n. 4, p.605-611.

Vanhaecke, D., Garcia de Leaniz, C., Gajardo, G., Young, K., Sanzana, J., Orellana, G., Fowler, D., Howes, P., Monzon-Arguello, C. , Consuegra, S. (2012). DNA Barcoding and Microsatellites Help Species Delimitation and Hybrid Identification in Endangered Galaxiid Fishes. *PLoS ONE*, 7(3), e32939.

Ward, R., Zemlak, T., Innes, B., Last, P. , Hebert, P. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.

Ward, R., Hanner, R. , Hebert, P. (2009). The campaign to DNA *barcode* all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74(2), 329-356.

Wasko, A.P. , Galetti Jr., P. (2002). *Hydrobiologia*, 474(1/3), 131-137.

Zaniboni Filho, E. (2004). *Catálogo ilustrado de peixes do Alto Rio Uruguai*. 1st ed. Florianópolis: Editora da UFSC.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda há poucos trabalhos que utilizam o DNA *barcode* e marcadores microssatélite para caracterização genética de cultivos comerciais, a maioria dos trabalhos aplica esta técnica para estudos de biodiversidade em estoques naturais ou como ferramenta de fiscalização de eventuais fraudes comerciais.

Os resultados deste trabalho sugerem que os cultivos comerciais devem passar a ter um maior controle do manejo reprodutivo de acordo com as distintas unidades genéticas registradas, evitando assim a produção de híbridos não-intencionais. Esse simples cuidado pode evitar a contaminação dos estoques naturais de *R. quelen*, bem como o eventual escape de possíveis indivíduos híbridos para o meio ambiente.

Adicionalmente, o presente trabalho visa contribuir com subsídios para futuras estratégias de avaliação do desempenho zootécnico de cada uma das distintas unidades genéticas identificadas, além de fornecer informações determinantes para futuros estudos de identificação e caracterização da espécie. Este trabalho sugere fortemente a implantação de ações de manejo que considerem a existência dessas unidades taxonômicas nas atividades de estocagem do jundiá em ambientes naturais, assim como na produção de juvenis da espécie destinada ao cultivo através de pisciculturas, além necessariamente, novos estudos devem ser desenvolvidos para delimitar as espécies do gênero *Rhamdia*, através de estudos interdisciplinares envolvendo a biologia molecular e da taxonomia tradicional.

REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL E MATERIAL E MÉTODOS GERAL

ABUCARMA, M; MARTINS-SANTOS, I.C. Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia* Species (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguacu Basin. *Cytologia* . International Society of Cytology, v. 66, n. 3, p.299-306, 2001.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Oxford Journals: Nucleic Acids Research*. Oxford, Uk, p. 4692-4693. set. 1997.

AMARAL JUNIOR, H; GARCIA, S; MELLO, G. L. Um peixe sob medida para a região sul do Brasil. *Panorama da Aquicultura*, v. 21, p.46-49, abr. 2011.

AMORIM, M. P., et al. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. *Aquaculture Research*, [s.l.], v. 40, n. 2, p.172-180, jan. 2009.

ANZA, J.A. Revisão das espécies do gênero *Rhamdia* (SILURIFORMES: HEPTATERIDAE) de drenagens costeiras do sul e sudeste do Brasil, um exemplo de diversidade do gênero. 2006. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/60557/0008550>>.

AVISE, J.C. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA. (684 pp.). 2004.

AZEREDO, A.M.L. Código de barras da vida baseado no DNA “Barcoding of Life”: Considerações e perspectivas. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2005.

BALDISSEROTTO, B; RADÜNZ NETO, J. Criação de Jundiá. Ed. UFSM. Santa Maria, cap.7, p.117-141, 2004.

BALDISSEROTTO B; RADÜNZ NETO, J; BARCELLOS, L.G. Jundiá (*Rhamdia* sp.). In: BALDISSEROTTO, B; GOMES, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2. ed. rev. e ampl. Santa Maria: Editora UFSM, 606p, 2010.

BARROSO, A.S., et al. Implantação do banco de DNA de peixes da Bacia Araguaia-Tocantins: aplicações na taxonomia, produção. Revista Integralização Universitária - Riu, Palmas, To, v. 7, p.173-180, set. 2013.

BAUMGARTNER, G, et al. Peixes do baixo rio Iguaçu. Maringá, Eduem, 203p. 2012.

BELLAFRONTE, E., et al. DNA *barcode* of Parodontidae species from the La Plata river basin - applying new data to clarify taxonomic problems. Neotropical Ichthyology, v. 11, n. 3, p.497-506, jun. 2013.

BLAXTER, M; FLOYD, R. Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. Trends In Ecology & Evolution, v. 18, n. 6, p.268-269, jun. 2003.

BLAXTER, M., et al. Defining operational taxonomic units using DNA *barcode* data. Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences. The Royal Society, v. 360, n. 1462, p.1935-1943, 29 out. 2005.

BLAXTER, M. Will DNA barcoding advance efforts to conserve biodiversity more efficiently than traditional taxonomic methods? Frontiers In Ecology And The Environment, v. 4, n. 5, p.268-273, jun. 2006.

BOCKMANN, F; GUAZZELLI, G. Family Heptapteridae (Heptapteridae), p. 406-431. In: REIS, R; KULLANDER, S; FERRARIS JR, C. (Eds). Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729p. 2003.

BOMBARDELLI, R. A., et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). Revista Brasileira de Zootecnia, v. 35, n. 4, p.1251-1257, ago. 2006.

BRANDÃO, J.H.S.G., et al. DNA barcoding of coastal ichthyofauna from Bahia, northeastern Brazil, South Atlantic: High efficiency for systematics and identification of cryptic diversity. *Biochemical Systematics And Ecology*, v. 65, p.214-224, abr. 2016.

BROWN, Samuel DJ et al. Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, v. 12, n. 3, p. 562-565, 2012.

CARNEIRO, P., et al. Jundiá: um grande peixe para a Região Sul. *Panorama da Aquicultura*, São Paulo, v. 12, p.41-46, 2002

CARNEIRO, P. A produção de jundiá em cativeiro. In: BALDISSEROTTO, Bernardo; RADÜNZ NETO, João. *Criação de Jundiá*. Ed. UFSM. Santa Maria, cap.7, p.117-141, 2004.

CARVALHO, D.C., et al. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 32, p.215-219, dez. 2008.

CIVADE, Roberta. et al. Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PLoS One*, v. 11, n. 6, p. e0157366, 2016.

COLDEBELLA, I.J., et al. The effects of different protein levels in the diet on reproductive indexes of *Rhamdia quelen* females. *Aquaculture*, v. 312, n. 1-4, p.137-144, fev. 2011.

DIAS, J. S., et al. HELMINTOS PARASITOS de *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) NO SUL DO BRASIL. *Science and Animal Health*, v. 4, n. 1, p. 02-20, 2016.

EARL, D.A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. Springer Nature, v. 4, n. 2, p.359-361, 13 out. 2011.

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

- ENKE, D.B.S., et al. Desempenho de alevinos de jundiá alimentados com silagem de rejeito de peixe. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 48, n. 8, p.1124-1127, ago. 2013.
- EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina Rede de pesquisa e tecnologia do jundiá *Rhamdia quelen*. Florianópolis, p.2 2012.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J.. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology, v. 14, n. 8, p.2611-2620, jul. 2005.
- FABREGAT, T.E..H.P., et al. Toxicidade aguda ao sal comum e larvicultura intensiva do jundiá *Rhamdia quelen* em água salobra. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 67, n. 2, p.547-554, abr. 2015.
- FALUSH, D; STEPHENS, M; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics, v. 164, n. 4, p. 1567-1587, 2003.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The state of World Fisheries and Aquaculture. Roma: Sofia, p.220. 2016.
- FERANTI, J.P.S., et al. Celioscopic liver biopsy in silver catfish (*Rhamdia quelen*). Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 35, n. 1, p.19-22, jan. 2015.
- FERGUSON, A. et al. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to Salmo. Journal Of Fish Biology, v. 47, n. , p.103-126, dez. 1995.
- FLOYD, R., et al. Molecular *barcodes* for soil nematode identification. Molecular Ecology, v. 11, n. 4, p.839-850, abr. 2002.
- GARCIA, Silvano et al. Induction of triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) by double temperature shock. Latin American Journal Of Aquatic Research, [s.l.], v. 45, n. 1, p.209-212, 10 mar. 2017.

GHIRALDELLI, L., et al. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 29, n. 4, p.349-356, 21 fev. 2008.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3) 2002.

GRESSLER, L.T., et al. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture Research*, v. 45, n. 6, p.1061-1072, 18 out. 2012.

GUICHOUX, E. et al. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, v. 11, n. 4, p.591-611, 12 maio 2011.

HALL, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98. 1999.

HASHIMOTO, D.T., et al. Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. *Aquaculture*. 321, n. 1-2, p.49-53, nov. 2011.

HASHIMOTO D.T., et al. Cartilha de Genética na Piscicultura : Importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA. Brasília, DF : Embrapa, 2012.

HASHIMOTO, D.T., et al. Genetic Identification of F1 and Post-F1 *Serrasalmid Juvenile* Hybrids in Brazilian Aquaculture. *Plos One*, v. 9, n. 3, p.e89902, 3 mar. 2014.

HASHIMOTO, D.T., et al. Molecular identification of intergenus crosses involving catfish hybrids: risks for aquaculture production. *Neotropical Ichthyology*, v. 14, n. 2, p.e150139, 2016.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA *barcodes*. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p.313-321, 7 fev. 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 101, n. 41, p.14812-14817, 1 out. 2004.

HENRIQUES, Jefferson Monteiro et al. Use of DNA *barcode* in the identification of fish species from Ribeira de Iguape Basin and coastal rivers from São Paulo State (Brazil). *Dna Barcodes*, [s.l.], v. 3, n. 1, p.118-128, 1 jan. 2015.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas). *Produção da pecuária municipal*. Rio de Janeiro, 2016. v.43, p.149.

JONES, M; GHOORAH, A; BLAXTER, M. JMOTU and Taxonomer: Turning DNA *Barcode* Sequences into Annotated Operational Taxonomic Units. *Plos One*, v. 6, n. 4, p.19259-19259, 25 abr. 2011.

KARIM, A., et al. Barcoding of fresh water fishes from Pakistan. *Mitochondrial Dna*, p.1-4, 18 maio 2015.

KNOX, M.A., et al. Mitochondrial DNA (COI) analyses reveal that amphipod diversity is associated with environmental heterogeneity in deep-sea habitats. *Molecular Ecology*, v. 21, n. 19, p.4885-4897, 25 ago. 2012.

LIS, J. T; SCHLEIF, R. The regulatory region of the l-arabinose operon: Its isolation on a 1000 base-pair fragment from DNA heteroduplexes. *Journal Of Molecular Biology*, v. 95, n. 3, p.409-416, jul. 1975.

LITT, M ; LUTTY, J.A. A.. Hypervariability microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Chicago*. p. 397- 401. 1989

LOPES, P; POUHEY, J.L.O.F.; ENKE, D.B.S. et al. Desempenho de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes níveis de energia na dieta. *Revista Biodiversidade Pampeana*, v.4, n.13, p.32-37, 2006.

LOPES, T.S., et al. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, n. 3, p.728-735, jun. 2009.

LOVATTO, N.M., et al. Inclusão de diferentes fontes de amido na dieta de jundiás (*Rhamdia quelen*): parâmetros metabólicos e bioquímicos. Ciência Animal Brasileira, [s.l.], v. 14, n. 3, p.299-304, 28 set. 2013.

MELA, M. et al. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). Ecotoxicology And Environmental Safety, v. 93, p.13-21, jul. 2013.

MELO, D. C. et al. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificações de plantéis de tilápias. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 32, p.220-224, dez. 2008.

MIA, M. Y., et al. Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. Aquaculture, v. 247, n. 1-4, p.267-273, jun. 2005.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. Estratégia nacional sobre espécies exóticas invasoras. Brasília 2009.

MOREIRA, A. A., et al. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 42, n. 4, p.521-526, abr. 2007.

NASCIMENTO, M.H.S., et al. DNA barcoding reveals high levels of genetic diversity in the fishes of the Itapecuru Basin in Maranhão, Brazil. Genetics And Molecular Research, v. 15, n. 3, p.1-11, 2016.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. Bioinformatics, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

PEREIRA, L. H.G., et al. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? BMC Genetics, v. 14, n. 1, p.14-20, 2013.

POUEY, J. L. O. F. et al. Productive Performance Of Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, Juveniles Stocked At Different Densities/Desempenho produtivo de juvenis de Jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos a diferentes densidades de estocagem. *Ars Veterinaria*, v. 27, n. 4, p. 241-245, 2011.

PRITCHARD, J; STEPHENS, M; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotypic data. *Genetic*, v. 155, p. 945-959, 2000.

RAMIREZ, J.L.; GALETTI JR, P. M. DNA *barcode* and evolutionary relationship within *Laemolyta Cope* 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, v. 93, p.77-82, dez. 2015.

RATNASINGHAM, S; HEBERT, P. D. N. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The *Barcode* Index Number (BIN) System. *Plos One*, v. 8, n. 7, p.e6621, 8 jul. 2013.

REIS; S.O. KULLANDER & C.J. FERRARIS JR (Eds). Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729p, 2003.

RIBEIRO, R. P., et al. Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservation. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 41, p.2375-2386, 2 set. 2016.

RIBOLLI, J. et al. Preliminary insights into the genetic mating system of Neotropical *Salminus brasiliensis*: kinship assignment and parental reconstruction reveal polygynandry. *Ichthyological Research*, v. 63, n. 1, p.187-191, 8 set. 2015.

RIBOLLI, J. et al. DNA barcoding confirms the occurrence of *Rhamdia branneri* and *Rhamdia voulezi* (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguçu River Basin. *Neotropical Ichthyology*, v. 15, n.1, p. e160147, mar. 2017.

- RÍOS, N. et al. Pyrosequencing for microsatellite discovery and validation of markers for population analysis in the non-model Neotropical catfish *Rhamdia quelen*. *Molecular Ecology Resources*, [s.l.], v. 13, p.1-15, mar. 2013.
- RODRIGUES, A.S., et al. Molecular Identification and Traceability of Illegal Trading in *Lignobrycon myersi* (Teleostei: Characiformes), a Threatened Brazilian Fish Species, Using DNA *Barcode*. *The Scientific World Journal*, v. 2016, p.1-7, 2016.
- SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). *Aquicultura no Brasil*. Brasília, p.71. 2015.
- SMITH, P. J.; MCVEAGH, S. M.; STEINKE, D. DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal Of Fish Biology*, v. 72, n. 2, p.464-471, fev. 2008.
- STEINKE, D; HANNER, R. The FISH-BOL collaborators' protocol. *Mitochondrial Dna*, [s.l.], v. 22, n. 1, p.10-14, 24 jan. 2011.
- STOECKLE, M. Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *Bioscience*, v. 53, n. 9, p.796-797, 2003.
- TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Oxford Journals: Molecular Biology and Evolution*. Oxford, Uk, p. 2725-2729. out. 2013.
- TAUTZ, D; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 12, n. 10, p.4127-4138, 1984.
- TYSKA, D. et al. Concentrados proteicos vegetais na alimentação de Jundiás (*Rhamdia quelen*). *Ciência Rural*, v. 43, n. 7, p.1251-1257, jul. 2013.
- WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p.1847-1857, 29 out. 2005.

WEBER, J; MAY, P. Abundant class for human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. Chicago. p. 388-396. Mar. 1989.

ZANIBONI FILHO, E. Catálogo ilustrado de peixes do Alto Rio Uruguai. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004. 128p.

APÊNDICES

Apêndice I: Tabela de indivíduos analisados no estudo ID (número de identificação), espécie, nome comum (Nome), localidade, selvagem, comercial, COI, SSR, voucher.

ID	Espécie	Nome	Localidade	Comercial	Selvagem	COI	SSR	Voucher
3660	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	X
3267	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	
3497	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	X
3581	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	X
3550	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	X
3622	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	
3685	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	X
3652	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	X
3653	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	X
3481	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	X
3270	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	
3675	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	X
3271	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	
3383	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	
3266	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	
3268	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	
3269	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai	X		X	X	
2967	Rhamdia quelen	Jundiá	Alto rio Uruguai		X			
2968	Rhamdia quelen	Jundiá	Caçador-SC	X		X	X	X
2974	Rhamdia quelen	Jundiá	Caçador-SC	X		X	X	
2994	Rhamdia quelen	Jundiá	Caçador-SC	X		X	X	
2996	Rhamdia quelen	Jundiá	Caçador-SC	X		X	X	
2997	Rhamdia quelen	Jundiá	Caçador-SC	X		X	X	

Continuação Apêndice I

3067	Rhamdia quelen	Jundiá	Canoinhas-SC			X			X	X
3686	Rhamdia quelen	Jundiá	Canoinhas-SC	X			X		X	X
3687	Rhamdia quelen	Jundiá	Canoinhas-SC	X			X		X	X
3688	Rhamdia quelen	Jundiá	Canoinhas-SC	X			X		X	X
3689	Rhamdia quelen	Jundiá	Canoinhas-SC	X			X		X	X
3690	Rhamdia quelen	Jundiá	Canoinhas-SC	X			X		X	X
3695	Rhamdia quelen	Jundiá	Camboriú-SC	X			X		X	X
3696	Rhamdia quelen	Jundiá	Camboriú-SC	X			X		X	X
3697	Rhamdia quelen	Jundiá	Camboriú-SC	X			X		X	X
3698	Rhamdia quelen	Jundiá	Camboriú-SC	X			X		X	X
3699	Rhamdia quelen	Jundiá	Camboriú-SC	X			X		X	X
3700	Rhamdia quelen	Jundiá	Camboriú-SC	X			X		X	X
3701	Rhamdia quelen	Jundiá	Camboriú-SC	X			X		X	X
2990	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X			X		X	X
2999	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X			X		X	X
3001	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X			X		X	X
3002	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X			X		X	X
3003	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X			X		X	X
3004	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X			X		X	X
3005	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X			X		X	X
3006	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X			X		X	X
3007	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X			X		X	X
3008	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X			X		X	X

Continuação Apêndice I

3009	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X	X	X	X
3010	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X	X	X	X
3011	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X	X	X	X
3012	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X	X	X	X
3013	Rhamdia quelen	Jundiá	Gaspar-SC	X	X	X	X
3789	Rhamdia quelen	Jundiá	Santa Maria-RS	X	X	X	X
3790	Rhamdia quelen	Jundiá	Santa Maria-RS	X	X	X	X
3791	Rhamdia quelen	Jundiá	Santa Maria-RS	X	X	X	X
3792	Rhamdia quelen	Jundiá	Santa Maria-RS	X	X	X	X
3793	Rhamdia quelen	Jundiá	Santa Maria-RS	X	X	X	X
3794	Rhamdia quelen	Jundiá	Santa Maria-RS	X	X	X	X
3795	Rhamdia quelen	Jundiá	Santa Maria-RS	X	X	X	X
3796	Rhamdia quelen	Jundiá	Santa Maria-RS	X	X	X	X
3797	Rhamdia quelen	Jundiá	Santa Maria-RS	X	X	X	X
3798	Rhamdia quelen	Jundiá	Santa Maria-RS	X	X	X	X
3068	Rhamdia quelen	Jundiá	Toledo -PR	X	X	X	X
3069	Rhamdia quelen	Jundiá	Toledo-PR	X	X	X	X
3088	Rhamdia quelen	Jundiá	Toledo-PR	X	X	X	X
3089	Rhamdia quelen	Jundiá	Toledo-PR	X	X	X	X
3090	Rhamdia quelen	Jundiá	Toledo-PR	X	X	X	X
3091	Rhamdia quelen	Jundiá	Toledo-PR	X	X	X	X
3092	Rhamdia quelen	Jundiá	Toledo-PR	X	X	X	X
3093	Rhamdia quelen	Jundiá	Toledo-PR	X	X	X	X
3094	Rhamdia quelen	Jundiá	Toledo-PR	X	X	X	X

Continuação Apêndice I

3095	Rhamdia quelen Jundiá Toledo-PR	X	X	X
2969	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2970	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2972	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2973	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2975	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2976	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2977	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2978	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2979	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2980	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2981	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2982	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2983	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2984	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2985	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2986	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2987	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2988	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2989	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2991	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2992	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X
2993	Rhamdia quelen Jundiá Médio rio Uruguai	X	X	X

Apêndice II: Fotos vouchers: Santa Maria, Canoinhas, Gaspar, Alto rio Uruguai, Toledo, Caçador e Médio rio Uruguai.



Voucher Santa Maria



Voucher Canoinhas



Voucher Gaspar



Voucher Alto rio Uruguai



Voucher Toledo



Voucher Caçador



Médio rio Uruguai

Apêndice III: Tabela de sequências COI de indivíduos obtidos da base de dado da BOLD e GenBank.

Espécie	Localização	Latitude-longitude	BOLD	GENBANK
<i>Rhamdia quelen</i>	Argentina, Mar Chiquita coastal lagoon	37.32S 57.19W	FARG317-07	EU074579
<i>Rhamdia quelen</i>	Argentina, El Divisorio stream	38.335S 61.6014W	FARGB235-11	JX111838
<i>Rhamdia quelen</i>	Argentina, El Divisorio stream	38.335S 61.6014W	FARGB236-11	JX111837
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Paraiba do Sul Basin	22.637S 44.616W	FPSR097-09	GU702119.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Paraiba do Sul Basin	22.637S 44.616W	FPSR095-09	GU702224
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Paraiba do Sul Basin	22.637S 44.616W	FPSR096-09	GU702176
<i>R. guatemalensis</i>	Guatemala, Alta Verapaz	15.78N 90.34W	MEFM531-06	EU751962.1
<i>Pimelodella sp</i>	Brazil, Upper Parana Basin	25.4198S 54.5356W	FUPR485-09	HM376392.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Paraiba do Sul Basin	22.637 S 44.616W	FPSR098-09	GU702117.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Paraiba do Sul Basin	22.637 S 44.616W	FPSR094-09	GU702223.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Paraiba do Sul Basin	17.8975S 40.6858W	MUCU083-13	
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Paraiba do Sul Basin	17.7431S 40.7947W	MUCU033-13	
<i>Rhamdia quelen</i>	Argentina, El Divisorio stream	38.335S 61.6014W	FARGB235-11	JX111838.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Argentina, El Divisorio stream	38.335S 61.6014W	FARGB236-11	JX111837.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Pampa Argentino	37.32S 57.19W	FARG317-07	EU074579.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Argentina, El Divisorio stream	38.335S 61.6014W	FARGB250-11	JX111840.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Argentina, Tributario rio Rojas	34.0828S 61.00W	FARGB297-11	JX111839.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Argentina, Rio Parana (San Nicolas)	33.3175S 60.2233W	FARGB365-11	JX111836.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Santana do Riacho	19.385S 43.659W	BSB025-10	HM404911.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Upper Parana Basin	17.0994S 48.7615W	FUPR778-09	GU701544.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Upper Parana Basin	17.0994S 48.7615W	FUPR777-09	GU701541.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Ribeirão Santo Inacio	19.878S 45.435W	BSB006-10	HM404895.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Santana do Riacho	19.34S 43.638W	BSB062-10	HM404948.1

Continuação Apêndice III

<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Rio São Francisco	18.725S 44.352W	BSB108-10	HM404986.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Rio São Francisco	19.468S 43.868W	BSB209-10	HM906011.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Rio São Francisco	17.984S 44.169W	BSB377-10	HM405188.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Upper Parana Basin	17.0994S 48.7615W	FUPR779-09	GU701543.1
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Rio Itapecuru	2.94S 44.36W	ITAPE403-15	
<i>Rhamdia quelen</i>	Brazil, Rio Itapecuru	2.94S 44.36W	ITAPE404-15	
<i>Rhamdia quelen</i>	México, Campeche	19.27N 90.63W	MEFM471-06	EU751957.1
<i>Rhamdia quelen</i>	México, Campeche	19.27N 90.63W	MEFM472-06	EU751956.1
<i>Rhamdia quelen</i>	México, Campeche	19.27N 90.63W	MEFM470-06	MEFM470-06
<i>Rhamdia quelen</i>	México, Campeche	19.27N 90.63W	MEFM473-06	EU751954.1

Apêndice V: Tabela dos indivíduos analisados, pertencendo a cada uma das MOTUs obtidas pelo programa Jmotu. Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM).

MOTU 1: VERDE	MOTU 2: VERMELHO	3653_ARU
2967_CAC	2969_MRU	3660_ARU
2968_CAC	2970_MRU	3675_ARU
2974_CAC	2971_MRU	3685_ARU
2994_CAC	2972_MRU	3695_CAM
2996_CAC	2973_MRU	
2997_CAC	2975_MRU	MOTU 3: AZUL
2998_CAC	2976_MRU	3090_TOL
3002_GAS	2977_MRU	3091_TOL
3003_GAS	2978_MRU	3093_TOL
3004_GAS	2979_MRU	3094_TOL
3005_GAS	2980_MRU	
3006_GAS	2981_MRU	MOTU 4:
3008_GAS	2982_MRU	<i>Rhamdia guatemalensis</i>
3069_TOL	2983_MRU	
3095_TOL	2984_MRU	MOTU 5:
3383_ARU	2985_MRU	<i>Pimelodella</i> _sp.
3612_GAS	2986_MRU	
3686_CANO	2987_MRU	
3687_CANO	2988_MRU	
3688_CANO	2989_MRU	
3689_CANO	2991_MRU	
3698_CAM	2992_MRU	
3700_CAM	2993_MRU	
3701_CAM	2999_GAS	
3791_SM	3001_GAS	
3792_SM	3007_GAS	
3793_SM	3009_GAS	
3794_SM	3010_GAS	
3798_SM	3011_GAS	
FARG317-07	3266_ARU	
FARGB235-11	3267_ARU_	
FARGB236-11	3268_ARU	
FPSR095-09	3271_ARU	
FPSR096-09	3481_ARU	
FPSR097-09	3497_ARU	
	3550_ARU	
	3581_ARU	
	3613_GAS	
	3652_ARU	

Apêndice VI: Caracterização de R. que len dos sete locos microsatélites, número de indivíduos (N); número de alelos (NA); riqueza alélica (RA); diversidade genética (DG), heterozigiosidade observada (Ho), heterozigiosidade esperada (HE); coeficiente de endocruzamento (Fis); probabilidade de déficit de heterozigotos (PL); probabilidade de excesso de heterozigoto (PS).

Grupo Amostral	Locos	N	NA	DG	RA	Ho	HE	Fis	PL	PS
Alto rio Uruguai	Rhq7	14	8	0,893	6,117	0,643	0,852	0,28	0,0143	0,9973
	Rhq15	15	14	0,929	7,161	0,6	0,887	0,354	0,0018	1
	Rhq26	15	10	0,817	5,558	0,6	0,782	0,265	0,0313	0,9902
	Rhq20	14	18	0,967	8,368	0,714	0,923	0,261*	0,0009*	1
	Rhq13	16	6	0,635	3,683	0,688	0,617	-0,082	0,808	0,4509
	Rhq28	14	15	0,953	7,973	0,786	0,913	0,176	0,042	0,9973
	Rhq2	15	17	0,955	8,072	0,8	0,918	0,162	0,0348	0,9946
	Rhq7	6	7	0,9	6,455	1	0,833	-0,111	1	0,5741
Caçador	Rhq15	5	7	0,925	7	0,8	0,82	0,135	0,3723	0,9473
	Rhq26	6	5	0,867	4,803	0,5	0,764	0,423	0,0625	0,9893
	Rhq20	6	7	0,933	6,455	0,667	0,833	0,286	0,0902	0,9911
	Rhq13	6	7	0,85	6,167	1	0,792	-0,176	1	0,392
	Rhq28	6	6	0,833	5,47	0,667	0,75	0,2	0,2598	0,9429
	Rhq2	6	6	0,9	5,636	0,667	0,806	0,259	0,1616	0,9732
	Rhq7	6	6	0,883	5,621	0,667	0,792	0,245	0,1759	0,9616
	Rhq15	6	6	0,783	5,333	1	0,736	-0,277	1	0,2161
Canoinhas	Rhq26	5	6	0,9	6	0,4	0,76	0,556	0,0152	1
	Rhq20	6	4	0,717	3,818	0,667	0,653	0,07	0,5732	0,7839
	Rhq13	6	7	0,933	6,455	0,667	0,833	0,286	0,0964	0,9875
	Rhq28	6	7	0,833	6,152	0,833	0,764	0	0,7661	0,7973
	Rhq2	6	5	0,8	4,652	0,667	0,722	0,167	0,3455	0,9161

Continuação do Apêndice VI

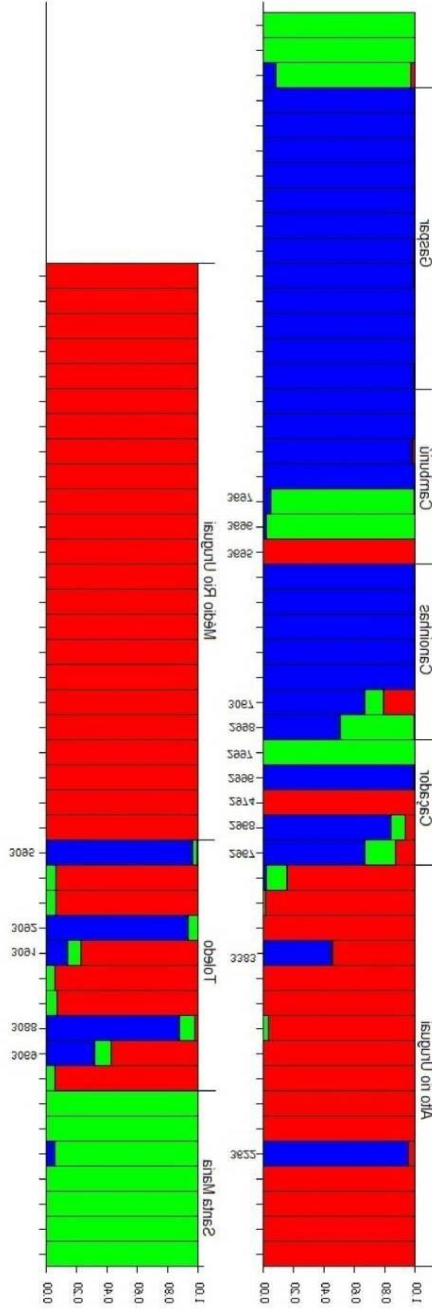
Camboriu	Rhq7	7	8	0,929	6,703	0,714	0,847	0,231	0,125	0,9786
	Rhq15	7	7	0,905	5,999	0,571	0,816	0,368	0,0223	0,9991
	Rhq26	7	8	0,845	6,275	1	0,796	-0,183	1	0,2884
	Rhq20	7	9	0,917	7,153	0,857	0,847	0,065	0,5286	0,8866
	Rhq13	7	6	0,821	5,13	1	0,776	-0,217	1	0,2741
	Rhq28	7	6	0,845	5,13	0,714	0,776	0,155	0,3571	0,892
	Rhq2	7	8	0,905	6,494	0,714	0,827	0,211	0,1571	0,992
Gaspar	Rhq7	12	10	0,848	6,27	0,833	0,813	0,018	0,6179	0,7688
	Rhq15	12	9	0,875	6,054	1	0,844	-0,143	1	0,2116
	Rhq26	12	10	0,833	5,895	0,833	0,799	0	0,6446	0,7205
	Rhq20	12	8	0,871	5,869	0,917	0,837	-0,052	0,8179	0,5411
	Rhq13	12	5	0,606	3,481	0,75	0,587	-0,238	0,9696	0,208
	Rhq28	12	6	0,746	4,569	0,833	0,719	-0,117	0,8804	0,3982
	Rhq2	12	8	0,883	6,059	0,917	0,847	-0,039	0,775	0,5821
Santa Maria	Rhq7	10	6	0,861	5,209	0,3	0,79	0,652	0,0018	1
	Rhq15	10	6	0,739	4,261	0,7	0,7	0,053	0,5438	0,7661
	Rhq26	10	11	0,917	7,071	0,9	0,87	0,018	0,5777	0,8054
	Rhq20	10	7	0,833	5,376	0,8	0,79	0,04	0,5304	0,7804
	Rhq13	10	6	0,817	4,961	1	0,785	-0,224	1	0,1545
	Rhq28	10	9	0,894	6,31	0,6	0,835	0,329	0,0205	0,9964
	Rhq2	10	9	0,9	6,442	0,6	0,84	0,333	0,0116	1

Continuação do Apêndice VI

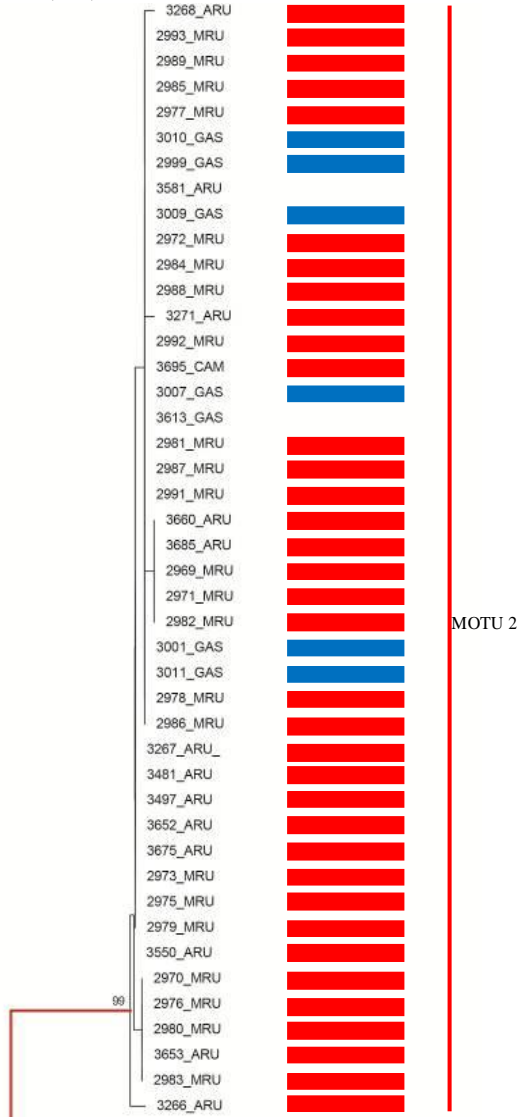
Toledo	Rha7	10	6	0,772	4,614	0,5	0,72	0,353	0,0411	0,9946
	Rhq15	9	11	0,91	7,077	0,556	0,84	0,389	0,0018	1
	Rha26	10	8	0,922	6,361	0,5	0,855	0,458	0,0027	1
	Rha20	9	11	0,896	7,077	0,778	0,84	0,132	0,2241	0,9688
	Rha13	10	5	0,794	4,334	0,7	0,75	0,119	0,35	0,8759
	Rha28	10	9	0,928	6,598	0,5	0,86	0,461	0,0018	1
	Rha2	10	9	0,894	6,16	0,6	0,835	0,329	0,0188	0,9991
Médio rio Uruguai	Rha7	23	13	0,905	6,808	0,87	0,885	0,039	0,383	0,8438
	Rha15	23	11	0,881	6,143	0,652	0,857	0,26	0,0045	1
	Rha26	23	10	0,837	5,63	0,609	0,814	0,273	0,0045	1
	Rha20	22	20	0,925	7,517	0,636	0,898	0,312*	0,0009*	1
	Rha13	23	10	0,875	6,02	0,739	0,853	0,156	0,0625	0,9759
	Rha28	22	14	0,912	6,997	0,773	0,888	0,153	0,0277	0,9946
	Rhq2	23	10	0,795	5,292	0,609	0,774	0,235	0,0179	0,9964

P=nível nominal indicativo ajustado (5%) comparações par-a-par P=0,001.

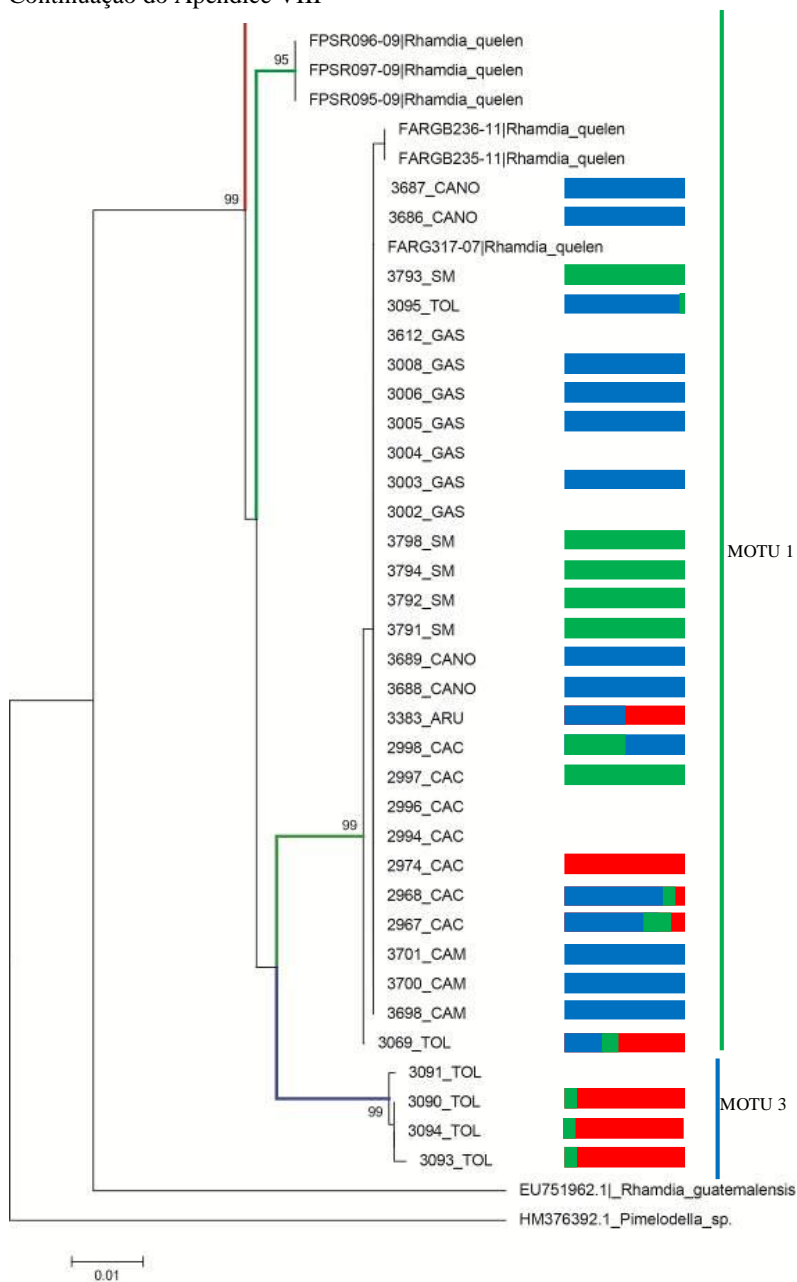
Apêndice VII: Gráfico plotagem em múltiplas linhas de atribuição individual de *R. quelen*, gerado através da análise bayesiana, no programa Structure. Cada cor representa os possíveis agrupamentos genéticos. Alguns grupos são predominantemente formados por indivíduos de determinada origem: vermelho - indivíduos selvagens (Alto e Médio rio Uruguai); azul - indivíduos de cultivos comerciais de Canoinhas, Gaspar e Camboriú; verde - indivíduos de cultivo comercial (Santa Maria) e Toledo



Apêndice VIII: Resultados comparativos entre as análises de *barcode* (árvore NJK2P) e microssatélites de *R. quelen*. Linhas Verde: MOTU 1, Vermelha: MOTU 2, Azul: MOTU 3. Sendo: Alto rio Uruguai (ARU), Médio rio Uruguai (MRU), Toledo (TOL), Gaspar (GAS), Canoinhas (CANO), Camboriú (CAM), Caçador (CAC) e Santa Maria (SM).



Continuação do Apêndice VIII



ANEXOS

Anexo I: Protocolo de extração de DNA proposto por Aljanabi; Martinez (1997) com algumas modificações.

1. Em um tubo 1,5 ml devidamente identificado:
 - Colocar 50–100 mg (0,5 cm²) de amostra (nadadeira, musculo)
 - Adicionar 400 µl de tampão de lise em cada amostra e vortexar por 30 segundos (tampão de lise: (0.4 M NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 2 mM EDTA pH 8.0)
 - 40 µl SDS a 20% (2% concentração final)
 - 8 µl proteinase K a 20 mg/ml (400 µg/ml concentração final)
 - Misturar bem.- VORTEXAR
2. Incubar as amostras a 55–65°C por +4 hrs (agitar a cada 30 minutos) ou overnight.
3. Adicionar 300 µl NaCl 6 M em cada amostra.
4. Mexer amostras com a mão por 3 min.
5. Centrifugar por 30 min a 13000rpm
6. Transferir 500-600 µl do sobrenadante para microtubos 1,5ml novos;
7. Adicionar uma alíquota igual (500 a 600 µl) de isopropanol gelado;
8. Virar os tubos suavemente ate ver o DNA (+-5 vezes)
9. Colocar no freezer por 1 hora.
10. Centrifugar as amostras por 15 min, a 13 000rpm.
11. Verter o sobrenadante cuidadosamente para não perder o pellet.
12. Adicionar 200µl de etanol 70% - Esperar 5 minutos e centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos;
13. Verter o sobrenadante cuidadosamente para não perder o pellet;
14. Adicionar 200 µl de etanol 100% - centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos;
15. Deixar o pellet secar;
16. Eluir o pellet: se o pellet for pequeno a médio, adicionar 40 µl de água Mili-Qe 10µl RNase para resuspender, se o pellet for médio a grande usar 90 µl de água MiliQ e 10µl RNase;
17. Incubar por pelo menos 1h a 37°C;
18. Quantificar em gel de agarose 1% e Nanodrop;
19. Diluir o DNA para concentração entre 30 a 50 ng/µl;

Anexo II: Purificação de PCR utilizando Peg 8000 Lis; Schleif (1975).

1. Verifique a qualidade do produto de PCR em gel de agarose;
2. Transfira, se necessário, o produto de PCR para um tubo de microcentrífuga de 0,5ml;
3. Adicione 1 volume (mesmo volume) de solução de PEG (PEG 8000 20% NaCl 2,5M) ao produto da PCR;
4. Incube a 37°C por 30 minutos;
5. Centrifugue a 13.000 RPM por 20 minutos;
6. Retire o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta P20-200 suavemente. (não retirar tudo para não perder o pellet);
7. Adicione 125µl de etanol 100% gelado 1º lavagem em tubo (ou etanol 80% gelado em placa). Espere 1 minuto e centrifugue por 2 minutos a 13000 RPM;
8. Retire o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador P20-200 suavemente. - Não retirar tudo!! (Descartar o sobrenadante);
9. Repita os passos 7 e 8 mais 2x com etanol 80% gelado;
10. Deixe evaporar o etanol residual utilizando o banho seco, estufa ou deixe sobre a bancada;
11. Ressuspender o pellet entre 5 e 15 µl* de água Milli-Q por pelo menos 2 horas (overnight de preferência). Caso não seja possível visualizar o pellet ressuspender em 5µl de água Milli-Q;
12. Quantifique o produto purificado em gel de agarose;

Anexo III: Protocolo de Precipitação da Reação de Sequenciamento:
Etanol, Acetato/ EDTA

1. Retirar a Placa ou tubos do Termociclador e dar um Spin rápido (700 rpm) (com o selo). Usar uma placa para equilibrar o peso;
2. Adicionar 2µl de EDTA 125 mM (PH 8) em cada amostra;
3. Adicionar 2µl de Acetato de Sódio 3M (ou acetato de Amônio 7,5 M) em cada amostra;
4. Adicionar 60µl de etanol 100% em cada amostra. Homogeneizar com a pipeta;
5. Cobrir a placa com papel alumínio e deixar incubar em temperatura ambiente por 15 minutos;
6. Colocar a placa (com selo) na centrífuga S430EPP por 50 minutos a 4680 rpm ou 30 mim a 3000 rcf (centrifuga á 4°C) (preparar outra placa com o volume de 84 µl nos mesmos poços para equilibrar o peso);
7. Retire o selo, descarte o líquido dos poços na pia, coloque um papel toalha na boca dos pocinhos e coloque invertido na centrífuga;
8. De um spin de 2000 rpm (centrifuga S430 EPP) (use uma placa vazia para equilibrar o peso)
9. Adicione 74 µl de etanol 70% em cada amostra;
10. Sele a placa e coloque na centrífuga S430EPP por 20 minutos a 4680 rpm ou 1650 rcf por 15 mim (centrifuga a 4°C) (equilibre com uma placa com o mesmo volume de 84ul de água);
11. Retirar o selo retire o liquido dos poços na pia, coloque um papel de toalha na boca dos poços e coloque invertido na centrífuga e de um spin de 2000 rpm (centrifuga S430 EPP);
12. Deixar secar por 30 minutos- no escuro;
13. Adicionar 10 ul de formamida em cada amostra;
14. Vortexar 2 minutos (com selo);
15. Dar um spin (com selo);
16. Colocar a placa no termociclador a 95°C por 5 minutos;
17. Colocar imediatamente no gelo por 3 minutos (cobrir a placa com alumínio);
14. Colocar no sequenciador;