

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
FACULDADE DE CIÊNCIAS - CAMPUS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS**

Gabriela Idaline de Freitas

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Astyanax lacustris* DO RIO
SAPUCAÍ-MIRIM: AÇÕES EFETIVAS COMO FORMA MITIGADORA NA
IMPLANTAÇÃO DAS PCH’S**

BAURU - 2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
FACULDADE DE CIÊNCIAS - CAMPUS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS**

Gabriela Idaline de Freitas

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Astyanax lacustris*
DO RIO SAPUCAÍ-MIRIM: AÇÕES EFETIVAS COMO FORMA
MITIGADORA NA IMPLANTAÇÃO DAS PCH'S**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista (UNESP), como
parte das exigências para a obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Assoc. Fábio Porto-Foresti

F866a

Freitas, Gabriela Idaline de

Análise da diversidade genética de *Astyanax lacustus* do Rio Sapucaí-Mirim : ações efetivas como forma mitigadora na implantação das PCH'S / Gabriela Idaline de Freitas. -- Bauru, 2022
20 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Fábio Porto-Foresti

1. Barramentos. 2. Diversidade genética. 3. Microsatélites. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



Laboratório de
Genética de Peixes
Unesp Bauru



BANCA EXAMINADORA



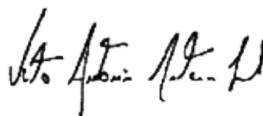
Prof. Assoc. Fábio Porto-Foresti

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de
Ciências, Bauru, SP)



Dra. Fernanda Dotti do Prado

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de
Ciências, Bauru, SP)



Dr. Vito Antonio Mastrochirico Filho

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de
Ciências, Bauru, SP)

Agradecimentos

Agradeço acima de tudo aos meus pais, Antônio e Waldicleia, por serem o meu pilar. Obrigada por sempre apoiarem minhas decisões e sonhos, oferecendo todo o suporte durante esses 5 anos. Dedico esse trabalho a vocês. À minha irmãzinha Liz, que entre tapas e beijos foi sempre a principal razão de todo meu esforço. À toda minha família, que estiveram presentes durante toda essa jornada promovendo amparo em diversos momentos.

Agradeço à minha prima Marina, que durante toda a graduação (e vida) me apoiou incondicionalmente nos melhores e piores momentos. Eu por você e você por mim, obrigada por tanto.

Aos meus amigos da faculdade, Ari e Rafa, que desde o primeiro ano foram os meus companheiros em trabalhos, provas, relatórios, rolês *gourmet*, festas, tudo. Obrigada por tornarem esses anos muito melhores e mais fáceis.

A todos do LAGENPE, Carol, Caio Goes, Diego, Vito, Pedrão, Fernanda, Tarja, Cahique, Raul, Milan, Ana, Léo, Henrique, Nat e Rai, obrigada por toda a ajuda e companheirismo. Ao Caio Felipe, por desde minha entrada ao laboratório ensinar sobre todos os procedimentos práticos e auxiliar na execução do meu projeto. À Yas e ao Zeni, por se tornarem os meus principais apoios emocionais nessa etapa final. Especialmente ao Zeni, por além disso, ser o meu porto seguro nos momentos em que mais precisei. Nenhum agradecimento nunca será o suficiente por tudo que fez por mim.

Agradeço sobretudo ao meu orientador, Fábio Porto-Foresti, por me guiar e acolher em seu laboratório. Obrigada por todo o suporte e ensinamentos durante essa fase.

A todos os integrantes do CEPTA, por auxiliar nas etapas de coleta, essenciais para a execução desse trabalho.

A FUNEP, por proporcionar o financiamento dessa pesquisa, possibilitando sua elaboração durante a iniciação científica.

RESUMO

O Brasil é um país com grande potencial hídrico, havendo assim diversos represamentos que são classificados em grandes Usinas Hidrelétricas (UHEs) ou Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs). O rio Sapucaí-Mirim, afluente da bacia do Alto Paraná, é um dos muitos que possuem PCHs ao longo de sua extensão. O impacto antrópico causado por esses barramentos interfere diretamente nas populações naturais da ictiofauna presente. Dessa forma, estudos de diversidade genética se tornam indispensáveis, coadjuvando com a implantação de medidas mitigadoras. Marcadores moleculares microsatélites são uma ferramenta muito utilizada em estudos de diversidade genética, devido à sua codominância, abundância no genoma dos eucariotos e grau de polimorfismo. Perante o exposto, o presente estudo utilizou marcadores microsatélites para analisar a diversidade genética de populações naturais de *A. lacustris* nos anos de 2013 e 2021, com o objetivo de verificar o impacto que esses represamentos têm sobre as populações naturais habitantes. Sete *loci* microsatélites pré-descritos pela literatura foram aplicados, tendo seus resultados posteriormente analisados por programas computacionais. De forma geral, ambas populações apresentaram uma alta diversidade genética. Os resultados obtidos podem ser explicados por conta da presença de medidas mitigadoras na região, pelo fato de as PCHs terem sido construídas recentemente, ou ainda por conta da grande capacidade adaptativa da espécie utilizada.

Palavras-chave: Barramentos, Diversidade genética, Microsatélites.

ABSTRACT

Brazil is a country with great hydroelectric potential, so there are several dams that are classified into Large Hydroelectric Plants (LHPs) or Small Hydroelectric Plants (SHPs). The Sapucaí-Mirim river, tributary of the Upper Paraná basin, is one of many that have SHPs along its length. The anthropic impact caused by these dams directly interferes with natural populations of the present ichthyofauna. That way, studies of genetic diversity become indispensable, helping to implement mitigating measures. Microsatellite molecular markers are a tool widely used in genetic diversity studies, because of their codominance, abundance in the eukaryote genome and degree of polymorphism. Thereby, the present study used microsatellite markers to analyze the genetic diversity of natural populations of *A. lacustris* in the years 2013 and 2021, with the objective of verifying the impact that these dams have on natural populations. Seven microsatellite loci pre-described in the literature were applied, and their results were later analyzed by computer programs. In general, both populations showed a high genetic diversity. The results obtained can be explained by the presence of mitigating measures in the region, by the fact that the SHPs have been built recently, or by the great adaptive capacity of the species used.

Keywords: Dam, Genetical Diversity, Microsatellites.

Sumário

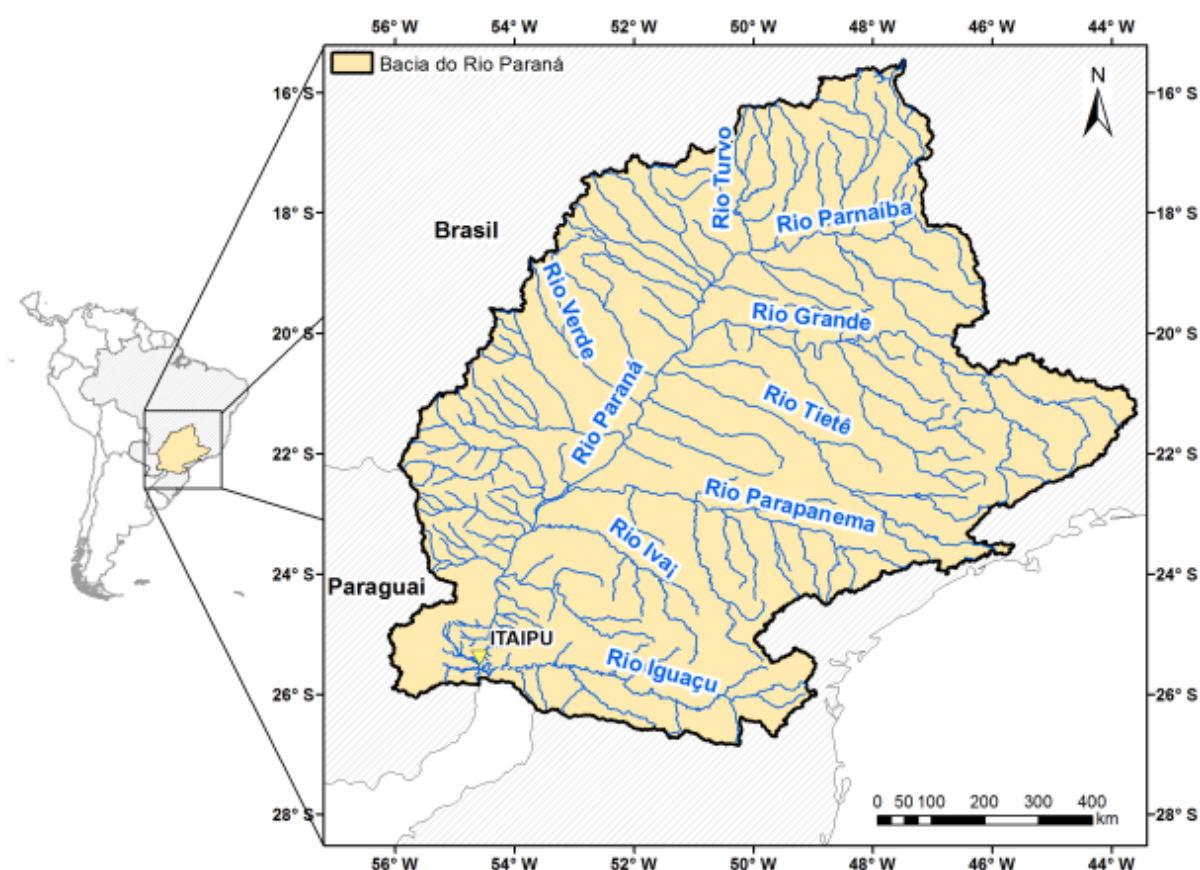
1	Introdução	1
1.1	Bacia do Alto Rio Paraná e o Rio Sapucaí-mirim	1
1.2	<i>Astyanax lacustris</i>	3
1.3	Interferência Antrópica	4
1.4	Marcadores moleculares	5
1.4.1	Marcadores Microsatélites	6
2	Objetivos	7
2.1	Objetivo geral	7
3	Materiais e Métodos	8
3.1	Local de coleta	8
3.2	Extração de DNA	9
3.3	Amplificação dos <i>loci</i> microsatélites	10
3.4	Análise de programas computacionais	12
4	Resultados	13
5	Discussão	15
6	Considerações finais	16
7	Referências	18

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bacia do Alto Rio Paraná e o Rio Sapucaí-mirim

A Bacia do Alto Rio Paraná (Figura 1) abrange uma área de aproximadamente 900 mil km², possuindo domínios morfoclimáticos que abrangem uma enorme biodiversidade (Langeani et al., 2007). Sua área está situada em uma região que engloba grandes centros urbanos, industriais e agrícolas, com isso, essa região acaba sendo uma das mais exploradas do país (Agostinho e Júlio Júnior, 1999).

Figura 1 – Localização da Bacia do Alto Rio Paraná

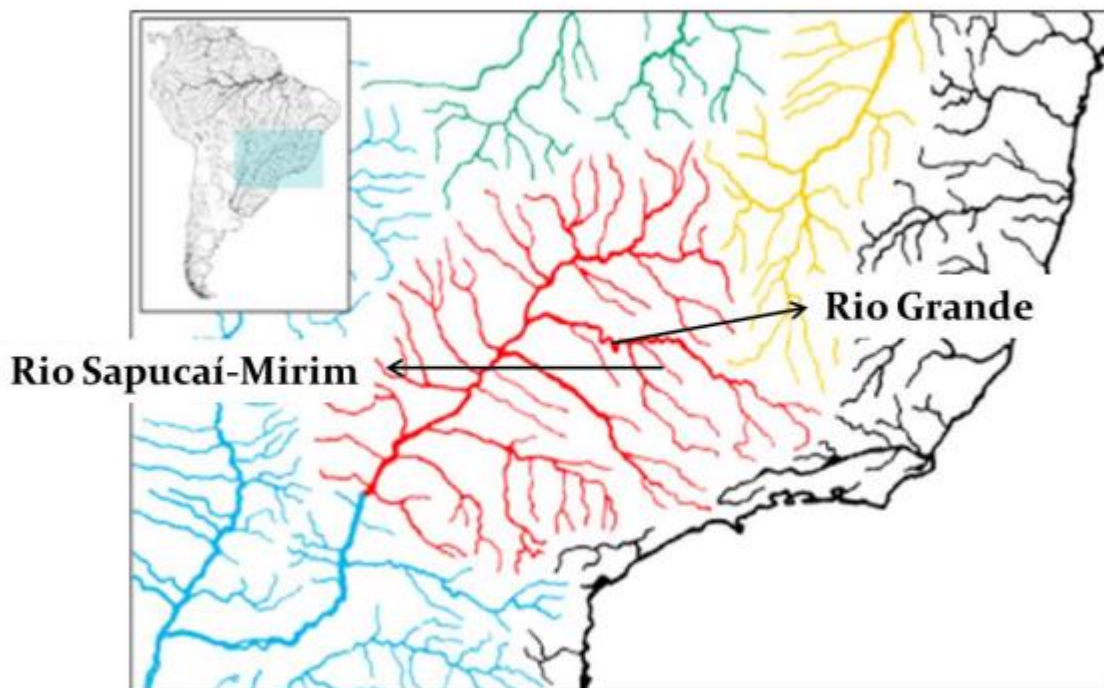


Fonte: (Pontes et al., 2013)

Dentre os integrantes da Bacia do Alto Rio Paraná, está o Rio Sapucaí-Mirim (Figura 2), apresentando 290km de extensão ele possui sua nascente no município de Sapucaí-Mirim em Minas Gerais, com seu percurso passando pelo estado de São Paulo, e desemboca no médio Rio Grande também em Minas Gerais. O rio apresenta características lóticis típicas, dispondo de fortes corredeiras e pequenas quedas

d'água em sua porção superior, tornando-se mais calmo próximo à sua desembocadura (Souza, 2014).

Figura 2 – Representação do sistema do Alto Rio Paraná (vermelho) com destaque para o Rio Sapucaí-Mirim e o Rio Grande.



Fonte: (Bambilha, 2016).

Essa região abriga uma diversa ictiofauna, com 310 espécies de peixes distribuídas em 11 ordens e 38 famílias (Langeani et al., 2007). Essas espécies possuem diversos portes que vão desde lambaris até pintados; as de pequeno porte são dependentes da vegetação marginal dos rios para fins tróficos, reprodutivos e abrigo, tendo preferência a habitar pequenos riachos e cabeceiras dos rios. Espécies de médio a grande porte possuem uma ampla distribuição geográfica, podendo migrar anualmente para fins reprodutivos e alimentação, como os indivíduos do gênero *Astyanax*, amplamente distribuídos nas bacias da América Central e do Sul, que possuem grande importância na pesca de subsistência, comercial e aquicultura. (Agostinho et al., 2007; Mendonça, 2018; Silva, 2020).

1.2 *Astyanax lacustris*

A Região Neotropical da América do Sul contém as bacias Amazônica e do Paraná, ambas muito importantes por abrigarem uma enorme diversidade da ictiofauna brasileira; a primeira com uma área de cerca de 7.000.000 km² e entre 1.500 e 5.000 espécies de peixes e a segunda com cerca de 2.600.00 km² comportando aproximadamente 600 espécies. A região do Alto Paraná possui aproximadamente 900.000 km², no intervalo brasileiro possui estimativas que variam de 130 espécies (Bonetto 1986), a mais de 250 (Agostinho e Júlio-Jr. 1999), sendo que estudos mais recentes afirmam ter 310 espécies, distribuídas em 11 ordens e 38 famílias, dentre as quais estão inseridas as ordens Siluriformes e Characiformes, possuindo a maior riqueza que correspondem a cerca de 80% das espécies dos grupos dominantes (Langeani, 2007).

Em Characidae, *Astyanax* é o gênero mais amplamente distribuído em águas doces neotropicais (Buckup et al., 2007), composto por 155 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2016). Espécies desse gênero tipicamente apresentam uma mancha umeral preta horizontalmente oval, duas listras verticais marrons e uma mancha preta caudal (Teixeira et al., 2018). *Astyanax lacustris* (Figura 3), popularmente conhecido como lambari-do-rabo-amarelo, é uma espécie migradora de pequeno porte amplamente distribuída em ambientes dulcícolas; possui grande importância ecológica, por servir de alimento para espécies de maior porte, e econômica por apresentar características que favorecem sua produção de cultivo, tendo também grande relevância na aquicultura, pesca esportiva e ser considerada um recurso pesqueiro (Porto-Foresti, 2001). *A. lacustris* é uma espécie muito utilizada em diversos estudos que vão desde filogenéticos até de diversidade genética e estruturação populacional (Mendonça, 2018).

Figura 3 – Exemplar de *Astyanax lacustris*.



Fonte: L.M Saermento-Soares

Devido a diversas ações antrópicas, a riqueza ictiofaunística neotropical está exposta a muitos impactos ambientais, sendo a bacia do alto rio Paraná uma das mais expostas devido a sua intensa exploração possuindo grandes centros urbanos, industriais e agrícolas (Agostinho e Júlio Júnior, 1999; Marques, 2019). Por conta da alta exploração, os ambientes da bacia sofreram alterações que repercutiram na diminuição na diversidade de sua ictiofauna (Souza, 2014).

1.3 Interferência Antrópica

Segundo Agostinho et al., 2007, toda ação sobre o ambiente gera um impacto sobre o funcionamento de sistemas regulados que indispensavelmente devem ser considerados. Com isso, toda interferência antrópica acaba refletindo diretamente na biodiversidade daquele ambiente.

Por conta de seu potencial hídrico, a bacia do alto rio Paraná é intensamente alterada por conta dos grandes represamentos, sendo estes intimamente ligados ao histórico da construção de usinas hidrelétricas, com aproximadamente 42% das

usinas instaladas no Brasil (Agostinho et al., 2007; Marques, 2019). As usinas hidroelétricas são responsáveis por aproximadamente 63,8% da energia elétrica brasileira (GOV, 2020). Com essas construções, as características hidrológicas do rio acabam sendo alteradas de um estado lótico para lântico ou semi-lântico com a formação dos compartimentos nos reservatórios, o que acaba forçando uma reestruturação das assembleias aquáticas (Souza, 2014).

Os reservatórios podem ser classificados em grandes Usinas Hidrelétricas (UHEs) e Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs). As PCHs vêm ganhando prioridade no incremento do setor elétrico por ser uma alternativa que atende as demandas de pequenos centros urbanos e áreas rurais mais afastadas (Agostinho et al., 2008; Mendonça, 2018). Os barramentos dos rios, produzidos durante a construção das UHEs e PCHs, impede a geração de novas condições ambientais à biota aquática, prejudicando as rotas migratórias dos peixes, assim como a capacidade biogênica do sistema e a disponibilidade de alimento e abrigo para os juvenis (Agostinho et. al., 2007; Souza, 2014).

Como resposta a esses impactos ambientais, foram implantadas leis com a obrigatoriedade de medidas mitigadoras de caráter geral, como a construção de escadas de peixes, peixamentos ou estações de piscicultura. O peixamento, ou repovoamento, está entre as ações de manejo mais aplicadas em todo o mundo; ela consiste na soltura de peixes provenientes de outros sistemas naturais ou de cultivo em um determinado corpo d'água (Agostinho et. al. 2007). Ao efetuar o peixamento, é de significativa importância realizar um estudo genético da espécie alvo visando otimizar os resultados do mesmo. Dessa forma, marcadores moleculares são uma ferramenta de análise genética que vêm sendo utilizada durante anos mostrando grande efetividade na verificação da diversidade genética de populações.

1.4 Marcadores moleculares

Com a descoberta da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na década de 80, houve uma grande revolução na área da genética que possibilitou análises rápidas e práticas de um grande número de indivíduos. Essa técnica consiste

na sintetização *in vitro* de milhões de cópias de um fragmento de DNA, realizado pela enzima DNA polimerase (Oliveira et al., 2021).

A partir da PCR, foram desenvolvidas diversas técnicas para análise de marcadores de DNA, caracterizados como um segmento específico de DNA vindo de herança genética que diferencia um ou mais indivíduos (Oliveira et al., 2021), podendo ser classificadas em três grupos: marcadores que são obtidos por hibridização, marcadores obtidos pela amplificação do DNA e aqueles obtidos pelo sequenciamento. A vantagem dos métodos que são baseados em PCR é que estes não precisam de uma grande quantidade de DNA para serem executados. Entre os marcadores baseados em PCR, temos: RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), ISSR (*Inter-simple sequence repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélite, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Oliveira et al., 2021; Turchetto-Zolet et al., 2017).

A análise e detecção de polimorfismos genéticos contribui para o entendimento da base molecular de vários aspectos biológicos, tornando-se muito importante para diversas áreas. As técnicas para estudos com marcadores moleculares permitem a identificação dos mesmos em escala genômica. Com isso, elas acabam unindo as características vantajosas de várias técnicas básicas, incorporando modificações na metodologia que aumentam a eficácia da genotipagem (Turchetto-Zolet et al., 2017).

Os polimorfismos de DNA surgem através de mutações sendo geralmente determinados pelo tipo de mutação que os criou. Os marcadores moleculares entram identificando esses polimorfismos, oferecendo um número quase ilimitado de informações distribuídas ao longo do genoma. Portanto, eles vêm sendo cada vez mais valorizados em diversos estudos genéticos (Turchetto-Zolet et al., 2017).

1.4.1 Marcadores Microssatélites

Os microssatélites, ou *Simple Sequence Repeats* (SSR), são marcadores genéticos com sequências repetidas em *tandem*, que vão de um a seis nucleotídeos, presentes no genoma dos eucariotos. As regiões de repetição contidas dentro da sequência de DNA são conservadas em uma espécie, o que permite a seleção de *primers* de PCR a serem amplificados pelos microssatélites (Lanza et al., 2000). Suas

regiões apresentam altas taxas mutacionais, se tornando altamente polimórficos em nível populacional (Pinheiro, 2018). Eles apresentam caráter codominante e estão dispersos por todo o genoma, além de possuir um grande potencial de automação e necessitar de pequenas quantidades de DNA para iniciar a amplificação em PCR. Devido às suas características, esses marcadores são muito empregados em estudos de diversidade genética em populações naturais (Oliveira, 2021).

Esse marcador já foi utilizado em diversos trabalhos anteriores de várias espécies do gênero *Astyanax*, como em *A. fasciatus*, *A. scabripinnis*, *A. intermedius*, *A. schubarti*, *A. gitton*, *A. parahybae* e em *A. Lacustris*, espécie de estudo deste trabalho, mostrando grande efetividade nas análises de diversidade populacional (Pinheiro, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Tendo em vista a necessidade de propor estratégias de conservação a fim minimizar os impactos causados pela construção de PCHs em tributários como o rio Sapucaí, o presente trabalho teve por objetivo:

- 1) determinar a estrutura populacional de populações naturais da espécie *Astyanax lacustris*, coletadas em épocas diferentes;
- 2) comparar os dados genéticos de diferentes épocas coletadas, afim de avaliar o possível impacto da construção das PCH's na variabilidade dos estoques em relação à população natural, através da comparação temporal de dados genéticos do início da construção das PCH's (cerca de 10 anos) com os tempos atuais, empregando loci microssatélites;

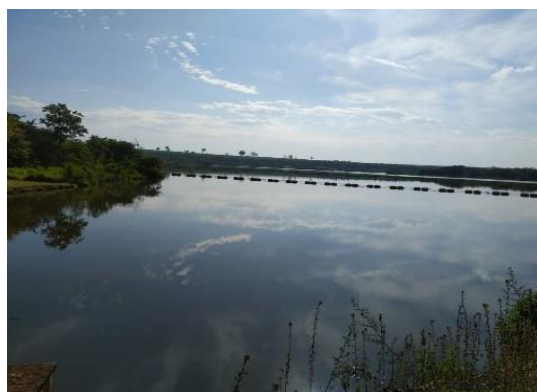
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de coleta

Os indivíduos utilizados nesse estudo foram coletados no rio Sapucaí-Mirim, tributário da bacia do Alto Paraná - SP, originários de populações naturais de *Astyanax lacustris*, coletados nas regiões das PCHs de Retiro e Palmeiras (figura 4). Ao todo foram analisados 47 exemplares, sendo 24 exemplares coletados no ano de 2021 (**população A**) e sendo 23 exemplares coletados no ano de 2013 (**população B**).

Figura 4 - Rio Sapucaí-Mirim, tributário da bacia do Alto Paraná - SP, PCH's de Palmeiras (a) e Retiro (b).

a



b



As amostras de tecido foram coletadas da nadadeira caudal dos espécimes e preservadas em álcool absoluto para posteriores análises moleculares. Esse material compõe o banco de tecidos do Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Bauru, São Paulo.

3.2 Extração de DNA

Para realizar a extração de DNA, foram retirados fragmentos de tecido da nadadeira caudal dos indivíduos amostrados, utilizando o kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification kit-Promega*”. Um pequeno fragmento do tecido foi cortado e colocado em tubo de microcentrifuga, adicionando 300 μ l de *Nuclei Lysis Solution* e 4,0 μ l de Proteinase K, as amostras foram colocadas em incubação no banho-maria por 2 horas a 60°C. Passado o tempo da primeira incubação, foram adicionados 2,5 μ l de RNase, e novamente colocados no banho-maria, agora a 37°C, em incubação por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 200 μ l de *Protein Precipitation Solution* e levados ao freezer por 20 minutos. Logo após as incubações, partiu-se para as etapas de centrifugação, sendo a primeira a 13.000 rpm por 4 minutos, retirando posteriormente o sobrenadante e transferindo-o para outro tubo com 600 μ l de isopropanol a temperatura ambiente. Uma nova centrifugação de 4 minutos a 13.000 rpm foi realizada, descartando agora o sobrenadante após a centrifugação. Para a

última etapa de centrifugação, foram adicionados 600 µl de etanol 70% e os tubos foram centrifugados por 4 minutos a 13.000 rpm, descartando novamente o sobrenadante com cuidado para não se desfazer do material genético aderido ao fundo do tubo. O material ficou em descanso *overnight* para secagem, após esse período adicionou-se 35 µl da solução de DNA *Rehydration Solution*, deixando o tubo em temperatura ambiente por 24 horas.

Para a etapa seguinte, verificou-se o resultado da extração e purificação de DNA genômico, assim como sua integridade, por meio do gel de agarose 1% corado com o corante fluorescente GelRed™ 1X (*Uniscience*) e BlueJuice™ 2X (*Invitrogen*). O gel foi visualizado através de um transiluminador UV (Loccus Biotecnologia). Com o intuito de analisar a diversidade genética da população, foram aplicados marcadores moleculares do tipo microssatélite a partir da amostragem e extração do DNA genômico.

3.3 Amplificação dos *loci* microssatélites

Com o objetivo de analisar a diversidade genética de *A. lacustris* do Rio Sapucaí-Mirim, foram selecionados sete dos doze *loci* microssatélite descritos anteriormente por Zaganini et al. (2012) (tabela 1), levando em consideração critérios importantes para o estudo genético de diversidade, como o grau de polimorfismo, especificidade e alelos nulos. A fim de otimizar os *loci* selecionados, foram feitas alterações no protocolo de amplificação em relação às concentrações dos reagentes e à temperatura de anelamento.

Tabela 1 - Descrição dos *loci* microssatélites para *A. lacustres* elaborado por Zaganini et al. (2012).

<i>Loci</i>	<i>Sequência do primer (5'3')</i>	<i>Repetição</i>	<i>Tamanho (pb)</i>	<i>T.A. (°C)</i>
<i>Asty</i> 4	F: GGTCACTGGAGGACAGATGTT R: GGCATGTGCTTGAATGGA	(AC)17	200	53
<i>Asty</i> 12	F: AGACACAATCAGCCGCCGAAATG R: ATCCCCTCTCCACAACCCAACACA	(GT)8	163	58
<i>Asty</i> 15	F: CAACTTTTACTTAAACCTGC R: ATGGGTCTTTACTGCTGAATGTAT	(AC)17 – (CT)6	212	50
<i>Asty</i> 16	F: AAAGTAAAGGGCATCTGTGGAGAA R: AGAGGGCATCATTGTACATTTTTG	(AC)10	165	52
<i>Asty</i> 23	F: TCAATGGAACCTATGGACAAC R: GTGGGAAGTAGCCTAATAAATA	(CA)12	160	52
<i>Asty</i> 26	F: CCCATTGATCCTGCCTCTAA R: CAGTCCTGACACAGAGAT	(GT)8	190	58
<i>Asty</i> 27	F: GCATTGTTTCAGGTTGGGTCT R: AAACGTGGTGAGAGGGAGTG	(GT)8	150	58

(pb) - Pares de bases; (T.A.) - Temperatura de anelamento; F: forward, R: reverse.

Para a amplificação dos microssatélites foi empregada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), através do uso de pares de primers, *forward* (F) e *reverse* (R). Os sistemas de sequenciamento em conjunto foram realizados através das características de cada *locus*, levando em consideração o tamanho (pb) dos mesmos. A partir disso, todos os primer *forward* (F) foram marcados na posição 5' com os seguintes fluorocromos: PETTM, FAMTM, NETTM e VICTM (*Applied Biosystems*). Com o intuito de os *loci* de mesmo tamanho não compartilharem o mesmo fluorocromo, a fluorescência para cada primer foi desenhada de forma específica.

A amplificação dos loci microssatélites foi dividida em dois multiplex possuindo duas reações diferentes com apenas um par de primers, *forward* (F) e *reverse* (R), separadamente. A reação para os loci *Asty* 4, *Asty* 15, *Asty* 16 e *Asty* 23 contém volume final de 18,05 µl com as seguintes concentrações: 1,4X Buffer; 94 uM de dNTPs; 3,12 mM de MgCl₂; 205 mM de cada *primer*; 0,25 U de Taq e 10-30 ng de DNA de cada primer. A reação para os loci *Asty* 12, *Asty* 26 e *Asty* 27 contém volume

final de 23,6 µl, com as seguintes concentrações: 1X de Buffer; 150 µM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂; 2 mM de cada *primer*; 0,2 U de Taq e 10-30 ng de DNA. Todos os *loci* microsatélites foram amplificados no termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*), seguindo as condições de desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguida de 35 ciclos que inclui desnaturação a 95° C por 30 s, hibridização variando de 55° C a 60° C por 30s, desnaturação a 72° C por 5s e extensão final a 72° C por 5 min (tabela 2).

Tabela 2 – *Loci* com alterações de temperatura utilizados.

<i>Loci</i>	Tamanho (pb)	T.A. (°C)	Fluorocromo	Multiplex
<i>Asty 4</i>	200	55	FAM	I
<i>Asty15</i>	212	55	VIC	I
<i>Asty 16</i>	165	55	PET	I
<i>Asty 23</i>	160	60	NED	I
<i>Asty 12</i>	163	60	PET	II
<i>Asty 26</i>	190	60	FAM	II
<i>Asty 27</i>	150	60	NED	II

(pb) - Pares de bases; (T.A.) - Temperatura de anelamento.

3.4 Análise de programas computacionais

Após as etapas laboratoriais, as amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador automático ABI 3730xl DNA Analyzer (*Applied Biosystems*), os resultados foram analisados no *GeneMapper* versão 4.0 (*Applied Biosystems*), sendo verificados e revisados manualmente.

Os desvios de equilíbrio de Hardy-Weinberd (HWE) e do índice de fixação (*Fis*) foram estimados utilizando o programa *GenePop* versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995), já o nível de riqueza alélica (*A_R*) foi avaliado utilizando o *software* Fstat 2.9.3

(Goudet, 2002). Para analisar o número de alelos por *locus*, número de alelos total, heterozigosidade esperada (H_E) e a heterozigosidade observada (H_O), foi utilizado o programa Cervus 3.0 (Kalinowski et al., 2007).

4 RESULTADOS

Foram analisadas no total 47 amostras de *Astyanax lacustris*, sendo amostradas 24 indivíduos coletados no ano de 2021 (referentes a população A, tabela 3) e 23 indivíduos coletados no ano de 2013 (referentes a população B, tabela 4). Para análise da diversidade genética interpopulacional foram utilizados sete loci microssatélites altamente polimórficos (tabela 2).

A população A (2021) apresentou valores médios de alelo por *locus* (A) de 9,86, riqueza alélica de 5.9, heterozigosidade observada (H_O) de 0.572 e heterozigosidade esperada (H_E) de 0.844. Já a **população B (2013)** apresentou valores médios de alelo por *locus* (A) de 9.42, riqueza alélica de 7.6, heterozigosidade observada (H_O) de 0.523 e heterozigosidade esperada (H_E) de 0.806.

O *locus* *Asty* 15 apresentou o maior número de alelo por *locus* nas duas populações estudadas, enquanto os *loci* *Asty* 16 e *Asty* 27 na **população A** apresentaram os menores números de alelos por *locus*, já na **população B** o *locus* que apresentou menor número foi o *Asty* 23. No que se diz respeito aos valores de riqueza alélica (A_r), observamos que o *locus* *Asty* 15 apresentou os maiores valores em ambas as populações, já os menores valores na população A foi *locus* *Asty* 16 e na população B no *locus* *Asty* 23. Em relação às heterozigosidades, as observadas em maiores valores foram encontradas no *locus* *Asty* 26 em ambos os anos estudados e os menores valores foram encontrados nos *loci* *Asty* 16 (**população A**) e *Asty* 23 (**população B**). Já a heterozigosidade esperada, encontramos a de maior valor no *locus* *Asty* 15 e a de menor valor no *locus* *Asty* 16, em ambas as populações.

Desvios significativos do HWE e valores positivos significativos do índice de endogamia (F_{IS}) ($P < 0.007$), após a correção de Bonferroni, foram observados nos dois anos estudados no *locus* *Asty* 15. Na população amostrada em 2021 foi possível observar desvios significativos também nos *loci* *Asty* 16 e *Asty* 23 e *Asty* 26. Já na

população amostrada em 2013 os *loci* que também apresentaram desvio significativo foram o *Asty* 26 e o *Asty* 27.

Tabela 3 – Resultados da análise computacional da população A.

<i>Locus</i>	<i>A</i>	<i>Ar</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>
<i>Asty</i> 4	10	6.0	0.625	0.873	0.291
<i>Asty</i> 15	15	8.2	0.500	0.958	0.487*
<i>Asty</i> 16	7	4.3	0.176	0.725	0.762*
<i>Asty</i> 23	8	5.5	0.500	0.843	0.415*
<i>Asty</i> 12	8	4.5	0.737	0.743	0.008
<i>Asty</i> 26	14	5.8	0.864	0.835	-0.035*
<i>Asty</i> 27	7	7	0.600	0.933	0.385
<i>média</i>	9.857	5.9	0.572	0.844	-

A – número de alelos por *locus*; *Ar* – riqueza alélica; *H_O* – heterozigosidade observada; *H_E* – heterozigosidade esperada; *F_{IS}* – índice de endogamia. *F_{IS}** indicam desvios significativos do HWE ($P < 0.007$).

Tabela 4 – Resultados da análise computacional da população B.

<i>Locus</i>	<i>A</i>	<i>Ar</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>
<i>Asty</i> 4	12	9.4	0.706	0.923	0.241
<i>Asty</i> 15	14	11.7	0.545	0.961	0.444*
<i>Asty</i> 16	7	5.5	0.333	0.605	0.460
<i>Asty</i> 23	5	4.6	0.300	0.679	0.571
<i>Asty</i> 12	10	6.7	0.611	0.754	0.194
<i>Asty</i> 26	10	7.1	0.789	0.845	0.067*
<i>Asty</i> 27	8	8.0	0.375	0.875	0.588*
<i>média</i>	9.429	7.6	0.523	0.806	-

A – número de alelos por *locus*; *Ar* – riqueza alélica; *H_O* – heterozigosidade observada; *H_E* – heterozigosidade esperada; *F_{IS}* – índice de endogamia. *F_{IS}** indicam desvios significativos do HWE ($P < 0.007$).

5 DISCUSSÃO

Ao analisarmos e compararmos os estoques amostrados nos anos de 2021 (**população A**) e 2013 (**população B**), notamos que ambos apresentaram uma alta diversidade genética, com valores de número de alelos por *locus* (A), riqueza alélica (A_r) e heterozigosidade esperada (H_E) muito similares.

O rio Sapucaí-Mirim foi muito afetado durante os anos devido às ações antrópicas ao longo de sua extensão, dentre elas a principal é as construções de PCHs (Souza, 2014). Estudos anteriores mostram que essas construções vêm afetando as populações naturais (Mastrochirico Filho et al., 2018), o que enfatiza a importância do monitoramento de sua diversidade genética, sendo essencial para a execução de medidas mitigadoras.

No presente trabalho os dois grupos amostrados (2021 e 2013) mostraram, de maneira geral, uma alta diversidade genética, apresentando valores de alelos por *locus* (A), riqueza alélica (A_r) e heterozigosidade (H_E) esperada muito semelhantes a estudos recentes feitos por Mendonça (2018), Limeira (2018) e Silva (2020) na mesma região. Diniz (2019) evidencia também que outras espécies presentes na mesma bacia, com destaque aos grandes migradores, apresentam uma alta diversidade genética, sendo capazes de vencer os obstáculos postos pelas mesmas interferências antrópicas.

Altos números significativos de homozigotos apareceram em ambas as populações, dando destaque para os *loci* *Asty* 15, *Asty* 16 e *Asty* 23 na população A e para os *loci* *Asty* 15, *Asty* 26 e *Asty* 27 na população B. A carência de heterozigotos pelos desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e valores do índice de endogamia (F_{IS}) pode ser explicado, segundo Mendonça (2018), pelo efeito de deriva genética, ocasionado em virtude de o número da população amostrada ser inferior ao número da população total, gerando um efeito de gargalo de garrafa, o que acaba não refletindo significativamente na população natural.

Os valores de diversidade genética obtidos pelas duas populações (2021 e 2013) foram esperadas, podendo ser justificados pelo fato de que as PCHs foram construídas nas últimas duas décadas, não havendo tempo o suficiente para apresentar uma grande diferença significativa, ou ainda pelo fato de que a espécie em

questão possui uma grande flexibilidade adaptativa, visto que de acordo com os dados obtidos por Limeira (2018), *A. lacustris* apresenta uma maior diversidade genética quando comparada com outras espécies de mesmo gênero, devido principalmente a sua capacidade de migração. Souza (2015) também conclui que tais dados resultam da alta plasticidade trófica e evolutiva que essa espécie apresenta, o que a permite habitar tanto ambientes prístinos como degradados.

Contudo, há ainda mais uma vertente que pode influenciar diretamente na manutenção da diversidade genética: práticas de peixamento (repovoamento) que são aplicadas ao longo do rio Sapucaí-Mirim. Uma delas é o *Supportive breeding*, uma prática conservacionista que consiste no cruzamento de indivíduos geneticamente distantes que pertencem a mesma localidade, a fim de diminuir as taxas de endogamia (Silva, 2020).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil é um país onde mais de 60% da energia utilizada é proveniente de hidrelétricas, sendo o rio Sapucaí-Mirim um dos muitos utilizados para suas instalações. Essas interferências antrópicas geram um impacto que atinge diretamente a ictiofauna, tornando os peixes o grupo mais ameaçado dentro de vertebrados.

O presente estudo objetivou analisar, utilizando microsatélites, duas populações de *A. lacustris* coletadas nos anos de 2013 e 2021, verificar a diversidade genética de ambas e comparar a diferença de dados entre esses 8 anos, visto a grande importância dessa espécie tanto para o rio Sapucaí-Mirim quanto para a bacia do Alto Paraná.

Durante anos, muitos estudos mostram a eficiência da utilização de marcadores moleculares microsatélites para analisar a diversidade genética de populações naturais, principalmente em regiões em que foram construídas centrais hidrelétricas. Com sua utilização, foi apresentado que ambas as populações (2013 e 2021) possuem uma alta diversidade genética, resultado que pode ser justificado levando em conta as medidas mitigadoras presentes na região, ao pouco tempo desde a

construção das PCHs e à capacidade adaptativa dos indivíduos da espécie em questão.

Por fim, é indispensável ressaltar a importância do monitoramento contínuo da diversidade genética, como também a implantação de medidas mitigadoras, em locais onde ocorre uma grande interferência antrópica, potencializando as ações conservacionistas.

7 REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JÚNIOR, H. F. Peixes da bacia do alto rio Paraná. LOWE-McCONNELL, Rose H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, p.374 - 400, 1999.

AGOSTINHO, A. A.; Gomes, L. C.; Pelicice, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: EDUEM, Maringá, cap. 6, p. 227-381, 2007.

AGOSTINHO A. A.; PELICICE F. M., GOMES L.C. Dams and the fish fauna of the Neotropica region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian Journal of Biology**, 2008.

BAMBILHA, E. M. Ambientes de pedrais como áreas estratégicas para a conservação da biodiversidade fluvial – um estudo da ictiofauna do rio Sapucaí-Mirim (SP) e suas interações tróficas. **Repositório institucional UNESP**, p. 1-92, 29 fev. 2016.

BONETTO, A. A. The Paraná river system. In **The ecology of river systems** (B.R. Davies & K.F. Walker, eds.). Dr. W.Junk Publishers, Dordrecht, p. 541-555, 1986.

BUCKUP P. A., MENEZES N.A., GHAZZI M.S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: **Museu Nacional**; 2007.

DINIZ, P. B. Estrutura e composição da ictiofauna no terço final da bacia do Rio Santa Bárbara, Sub-bacia do Rio Sapucaí-Mirim, São Paulo, Brasil. 2019.

ESCHMEYER W. N., FONG J. D. Species by family/ subfamily in the Catalog of Fishes. [Versão eletrônica]. San Francisco (CA): **California Academy of Sciences**; 2016. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>

GOUDET J. (2002) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/Fstat.html>. Updated from Goudet (1995).

GOV – Governo do Brasil. Fontes de energia renováveis representam 83% da matriz elétrica brasileira. 21 jan. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/energia-minerais-e-combustiveis/2020/01/fontes-de-energia-renovaveis-representam-83-da-matriz-eletrica-brasileira>. Acesso em: 3 mar. 2022.

KALINOWSKI, S. T. *et al.* Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, 14 fev. 2007.

LANGEANI, F. *et al.* Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 181-197, 19 out. 2007.

LANZA, M. A. *et al.* Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Biotecnologia**, p. 97-108, 1 jan. 2000.

LIMEIRA, D. M. Estudos genético-populacionais em *Astyanax aff. Scabripinnis* da região da Serra da Mantiqueira. 2018.

MARQUES, H. Variações espaço-temporais da ictiofauna de quatro reservatórios do alto Paraná: uma abordagem de longo termo e aspectos de conectividade fluvial. 2019.

MASTROCHIRICO FILHO, V. A. *et al.* Genetic applications in the conservation of neotropical freshwater fish. In: **Biological resources of water**. IntechOpen, 2018.

MENDONÇA, B. B. Análise genética da reposição de estoques de peixes na bacia do rio Sapucaí-mirim (sp): implicações na conservação. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Unesp-Botucatu. 2018.

OLIVEIRA, A. J. *et al.* Principais marcadores moleculares. **Research, Society and Development**, v. 10, p. 1-7, 26 nov. 2021.

PONTES, P. R. M. *et al.* Análise da sensibilidade da vazão do Rio Paraná a potencial alteração da precipitação. **Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**, p. 1-8, nov. 2013.

PORTO-FORESTI F. Análise das regiões organizadoras de nucléolo polimórficas em truta Arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*): mecanismo de herança e efeitos no desenvolvimento, 119 f. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

RAYMOD M; ROUSSET F. GENEPOP 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

SILVA, C. F. Pequenas centrais hidrelétricas no rio Sapucaí-mirim (sp): diversidade e estrutura genética de *Astyanax lacustris*. Repositório Institucional UNESP, p. 1-53, 16 fev. 2020.

SOUZA, D. F. Interferência das construções sucessivas de Pequenas Centrais Hidroelétricas (PCH), sobre a ictiofauna do rio Sapucaí-Mirim-SP, Brasil. 2014. 82 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2014.

TEIXEIRA, T. K. S. S. *et al.* Comparative cytogenetics of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from the upper Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**, p. 1-7, 26 mar. 2018.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. *et al.* Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. **Sociedade Brasileira de Genética**, 2017. 181 p.