

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CAIO FELIPE DA SILVA

**PEQUENAS CENTRAIS HIDRELÉTRICAS NO RIO SAPUCAÍ-MIRIM (SP):
DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Astyanax lacustris***

MESTRADO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**PEQUENAS CENTRAIS HIDRELÉTRICAS NO RIO
SAPUCAÍ-MIRIM (SP): DIVERSIDADE E ESTRUTURA
GENÉTICA DE *Astyanax lacustris***

CAIO FELIPE DA SILVA

FÁBIO PORTO-FORESTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia).

BOTUCATU – SP

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s.n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
posgraduação@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Caio Felipe.

Pequenas centrais hidrelétricas no Rio Sapucaí-Mirim (SP)
: diversidade e estrutura genética de *Astyanax lacustris* /
Caio Felipe Silva. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Fábio Porto Foresti

Capes: 20204000

1. Variação genética. 2. Microssatélites (Genética). 3.
Usinas hidrelétricas. 4. *Astyanax* (Peixe). 5. Sapucaí, Rio,
Bacia (SP e MG).

Palavras-chave: Barramentos; Diversidade genética;
Microssatélites.

“É melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito e nem sofrem muito, pois não conhecem nem a vitória e nem a derrota.”

Theodore Roosevelt

*Aos meus pais, Renaldo e Valdirene, irmãos Taisa e Mateus e em
memória de minha avó Luzia. Obrigado pelo apoio mesmo nos
momentos mais difíceis, pois foram indispensáveis nessa grandiosa
etapa da minha vida.*

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, em especial:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Porto Foresti, por me aceitar no seu laboratório desde 2015, quando iniciei na vida acadêmica no início da minha Iniciação Científica. Desde então mostrou-se sempre à disposição em todos os momentos, mesmo quando a ansiedade e inquietação estavam no limite. Obrigado pelo incentivo, oportunidades e principalmente pela confiança que sempre teve em mim. Que continuemos trabalhando juntos!!

Ao Prof Dr. Diogo Teruo Hashimoto e todos do seu laboratório (LAGeAC) pela ajuda e recepção ao longo dessa jornada. Em especial a Milena, Raquel, Valéria, Jhon e Flower (rs).

Aos técnicos do CAUNESP, seu Valdecir e seu Perereca, pela grande ajuda nas coletas, desde das escadas até os reservatórios das PCHs e principalmente pela paciência em ensinar.

A amiga Bruna Bueno Mendonça, “ex-lagepeana”, que também foi responsável por me ensinar tudo o que eu sei, principalmente pela paciência que sempre teve comigo. Saudades, Bru.

Aos também ex-lagenpeanos: Sandrão, Manolo, Aline, Déia, Maíce, Will e Eggs (Egberto), principalmente pela ajuda, pela recepção nos anos que convivemos juntos.

Aos mais que colegas de trabalho, meus amigos: Diego, Carol (Papiro), Caio Goes, Cahique (Deby), Raul (Loyd), Zeni, Pedrão, Yasmin, Mariana,

Gabriela, Ana Luíza, Léo, Rafinha, Milan e Ari. Obrigado meus amigos, essa conquista é nossa!!

Aos pesquisadores, Fer e Tarja, pela paciência e ajuda nos momentos bons e ruins. Obrigado amigos, vocês merecem o mundo!

Aos amigos a vida, que me acompanharam desde o início do meu processo de alfabetização até o ingresso na Universidade. Bruna, Jú, Carol, eu amo vocês.

Às minhas “pocs” lindas: Gislene, Danilo, Gabi Cervatti, Fran, Larissa Kashiwa e Gramôs.

Ao presente que Bauru me deu, a minha segunda família: José, Rosa Virgínia, Walter, Lucas e Amanda. O apoio de vocês foi fundamental e obrigado por tudo.

Aos meus tios, tias, primos, primas e ao meu afilhado Davi: vocês são tudo pra mim. Se eu pudesse escolher, na próxima vida eu quero ter vocês de novo. AMO VOCÊS incondicionalmente.

Aos meus avós: Renne, Zé mineiro, Alicia e em especial a minha avó Luzia (em memória), minha segunda mãe, minha confidente, minha cuidadora, meu porto seguro, meu anjo que está cuidando de mim aí do céu, ao lado de Deus.

Aos meus pais, Valdirene e Renaldo, irmãos Taísa e Mateus: impossível não escrever esse agradecimento com lágrimas nos olhos. Obrigado pelo apoio, mais que financeiro, emocional! A cada pensamento de desistir, a cada crise de ansiedade vocês sempre estiveram do meu lado. Serei eternamente grato.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) onde realizei a minha graduação em Ciências Biológicas (Faculdade de Ciências) e a minha pós-graduação - mestrado acadêmico (Instituto de Biociências de Botucatu-IBB).

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (ZOOLOGIA), Unesp-Botucatu, que possibilitou o desenvolvimento desta dissertação.

A todos os funcionários e docentes da Unesp de Bauru e de Botucatu.

À CTG Brasil pelo financiamento, que foi de grande ajuda para realização deste trabalho.

RESUMO

O rio Sapucaí-mirim está localizado na bacia do alto rio Paraná e apresenta uma grande diversidade de peixes neotropicais. Dentre eles, encontra-se a espécie *Astyanax lacustris*, popularmente conhecida como “lambari-do-rabo-amarelo”, abundante na região. A bacia do alto rio Paraná vêm enfrentando construções de inúmeras Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) e pouco se sabe a respeito do seu impacto nas populações naturais. Marcadores moleculares microsatélites são amplamente utilizados em estudos de diversidade e estruturação genética, principalmente devido a sua codomiância, abundância no genoma dos eucariotos e polimorfismo. Dado o exposto, o presente estudo analisou a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *A. lacustris* coletadas a montante (reservatório da PCH de Palmeiras) e a jusante (escada da PCH de Retiro) nos anos de 2018 e 2019 utilizando marcadores microsatélites, afim de se ter mais dados a respeito do impacto dos barramentos nessas populações naturais de peixes. Sete *loci* microsatélites foram aplicados e programas computacionais foram utilizados para as análises. Os resultados mostraram, que de maneira geral, os quatro estoques amostrados apresentaram uma alta diversidade genética e afirmou-se a eficiência desses marcadores. No que se diz respeito a estruturação genética, foram detectados três grupos diferenciados entre si: um grupo à montante (reservatório da PCH de Palmeiras) e dois grupos amostrados a jusante, nos anos de 2018 e 2019, respectivamente. A alta diversidade genética pode ser explicada, além da capacidade dessa espécie de se adaptar a condições ambientais hostis, a práticas de repovoamento por técnicas de *supportive breeding*. Um outro fator que pode ter levado a esse resultado é que ambas PCHs foram contruídas recentemente. O fato das escadas das PCHs brasileiras apenas permitiram a passagem no sentido jusante-montante, pode explicar o fato da diferença populacional encontrada entre os estoques das escada da PCH de Retiro (jusante) entre os anos e a diferença da mesma com o grupo identificado a montante. Por fim, este trabalho ressalta a importância da implementação de medidas mitigadoras, além de servir como base para futuros trabalhos, uma vez que os estudos de monitoramento inicial e contínuo de diversidade e estrutura de peixes são escassos no Brasil.

ABSTRACT

The Sapucaí-mirim river is located in the upper Paraná river basin and has a huge diversity of neotropical fish. The species *Astyanax lacustris*, popularly known as the “lambari-do-rabo-amarelo”, is widely abundant in the region. The upper Paraná river basin has been facing the construction of countless Small Hydroelectric Plants (SHPs) and a few information about its impact on wild populations is known. Microsatellite molecular markers are widely used in diversity studies and genetic structuring mainly due to their codominance, abundance in the eukaryote genome and polymorphism. For this purpose, the present study analyzed the diversity and genetic structure of wild populations of *A. lacustris* collected upstream (Palmeiras SHP reservoir) and downstream (Retiro SHPs ladders) in 2018 and 2019 using microsatellite markers, in order to have more data on the impact of dams on these wild fish populations. Seven microsatellite *loci* were applied and computer programs were used for the analyzes. The results showed that, in general, the four sampled stocks presented a high genetic diversity and the efficiency of these markers was affirmed. With regard to genetic structure, three differentiated populations were detected: one upstream population (Palmeiras SHP reservoir) and two populations sampled in the Retiro SHP ladders in 2018 and 2019, respectively. The high genetic diversity can be explained, in addition to the ability of this species to adapt to hostile environmental conditions, to supportive breeding restocking practices. Another factor that may have led to this result is that both SHPs were recently built. The fact that the ladders of the Brazilian SHPs only allowed the passage downstream, explains the fact of the population difference found between the stocks of the SHP Retiro ladders between the years and the population difference of the same with the identified population upstream. Finally, this work highlights the importance of implementing mitigation measures, as well serving as a basis for future work, since the initial and continuous monitoring studies of fish diversity and structure in Brazil are scarce.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Ictiofauna Neotropical e o rio Sapucaí-Mirim	1
1.2 Barramentos e interferência na ictiofauna	3
1.3 A espécie <i>Astyanax lacustris</i>	6
1.4 Marcadores moleculares	8
1.4.1 Marcadores moleculares microssatélites	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3.MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Locais de coleta dos exemplares	12
3.2 Material biológico	15
3.3 Extração de DNA	16
Seleção e aplicação dos <i>loci</i> microssatélites	17
3.5 Análise dos dados	21
3.5.1 Diversidade genética e estruturação de <i>A. lacustris</i>	21
3.5.1.1 Diversidade genética intrapopulacional	21
3.5.1.2 Diversidade genética entre populações	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
Artigo	24
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
7. ANEXOS	49
Anexo 1	49
8. APÊNDICES	50
Apêndice 1	50
Apêndice 2	51
Apêndice 3	52
Apêndice 4	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ictiofauna Neotropical e o rio Sapucaí-Mirim

A região Neotropical compreende a América Central, sul do México e da Flórida, Caribe e toda América do Sul. Esta região apresenta uma grande diversidade de peixes marinhos e continentais (ARRINGTON et al., 2006; FILHO et al., 2018). Os peixes de água continental e marinha da América do Sul representam o grupo mais diverso dentre os vertebrados, com uma riqueza superior a 9.100 espécies e desse total, 5.160 são espécies de água doce. Uma média de 104 espécies são descritas por ano nesta região e cerca de 28% delas foram descritas nos últimos 11 anos (REIS et al., 2016).

A maior parte da ictiofauna continental desta região abriga à classe Actynopterygii, distribuída em três ordens: Siluriformes (42%), Characiformes (39%) Cyprinodontiformes (11%) (HALES e PETRY, 2008). Este elevado número de espécies se deve à grande heterogeneidade das bacias hidrográficas da região Neotropical, onde o Brasil está inserido (BUCKUP et al. 2007).

No Brasil, a bacia do alto rio Paraná é o segundo maior sistema de drenagem na América do Sul, com 3,2 milhões de km² (LOWE-McCONNELL, 1999). Esta região apresenta uma ictiofauna diversa, onde são registradas aproximadamente 360 espécies, algumas ainda não descritas em nível específico e que vêm sofrendo com a degradação ambiental em larga escala (CARVALHO e LANGEANI, 2013; SERRA et al., 2015). É formada pela junção do rio Grande e Parnaíba no centro-sul do Brasil, abrigando cerca de 10, 5% do território brasileiro, incluindo o norte do estado do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul, a maior parte do estado de São Paulo, sul de Minas Gerais e uma

pequena área do Paraguai oriental (AGOSTINHO e JÚLIO, 1999; Agostinho et al., 2003).

A maior riqueza é composta pelos indivíduos das ordens Siluriformes e Characiformes, que abrange cerca de 80% das espécies e compõem os grupos dominantes na maior parte dos ambientes lóticos do alto Paraná (LANGEANI et al., 2007). Esta bacia abriga o rio Sapucaí-Mirim, tributário situado a noroeste do estado de São Paulo e compreende a uma área de 9.166,86 km² (CBH, 2012).

O rio Sapucaí-Mirim nasce próximo ao município de Franca (SP) e deságua no Rio Grande (ANA, 2015). A ictiofauna desta região é muito similar a encontrada em outros rios da bacia do alto rio Paraná, com dominância das ordens Characiformes (46%) e Siluriformes (39%) (CESÁRIO, 2010). A presença de grandes migradores como *Prochilodus lineatus* e *Salminus brasiliensis* nos trechos deste rio demonstram a importância deste como rota de migração e área de reprodução destas espécies, uma vez que necessitam realizar grandes migrações para completar seu ciclo de vida (AGOSTINHO et al., 2007; CESÁRIO, 2010).

Apesar dos tributários apresentarem grande importância como rota migratória e região de desova de diversas espécies continentais como no caso dos indivíduos do gênero *Astyanax*, amplamente distribuídos nas bacias da América Central e do Sul, o seu curso natural vem sendo fragmentado pelas construções de barramentos para produção de energia (COWX, 2002).

1.2 Barramentos e interferência na ictiofauna

As populações naturais de peixes Neotropicais vem sendo ameaçadas principalmente devido às atividades antrópicas, como a sobrepesca, introdução de espécies nativas, contaminação dos rios através de atividades mineradoras, poluição industrial e agrícola, além da construção de centrais hidrelétricas (AGOSTINHO et al., 2003; PELICICE et al., 2017).

O crescimento da população mundial vem contribuindo consideravelmente, o que faz aumentar a demanda por diferentes tipos de recursos, como por exemplo, a demanda por energia elétrica (CADA e ZADROGA, 1982). No Brasil, o potencial hídrico desencadeou a exploração e geração de energia hidrelétrica como principal fonte de eletricidade do país sendo que mais de 80 % da energia elétrica gerada no país no ano de 2006, resultado da energia provida de barramentos (AGOSTINHO et al., 2007).

Os barramentos podem ser classificados em Usinas Hidrelétricas (UHEs) e Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs), de acordo com a sua capacidade de gerar energia. A suas construções afetam os cursos hídricos dos rios, resultando na formação de um novo ecossistema. A formação de lagos artificiais e fragmentação do curso natural dos rios são algumas das consequências da construção desses barramentos (CROOK et al., 2015).

Com a formação desse novo ecossistema, poderá haver modificação na estrutura de peixes que habitavam o local e o estabelecimento de novas comunidades passará a depender das condições físicas, químicas, geomorfológicas e hidrológicas como resultado da redistribuição espacial e temporal do fluxo do rio (FILHO et al., 2018).

Diversas ações mitigadoras têm sido propostas para diminuir os impactos dos barramentos, como por exemplo os Sistemas de Transposição de Peixes (STPs) em diferentes bacias da América do Sul. Esses sistemas foram desenvolvidos com a finalidade de manter as rotas migratórias dos estoques de peixes no período de migração para reprodução e podem ser de vários tipos: escadas, eclusas ou elevadores (CEMIG, 2012). Porém, pouco se sabe a respeito de sua distribuição geográfica assim como o esforço de pesquisa aplicado para entender seu funcionamento e limitações (AGOSTINHO et al., 2007; PELICICE et al., 2017).

Larinier (2001) define a efetividade e eficiência de um STP como a capacidade de um mecanismo permitir a passagem de uma espécie alvo nas condições ambientais do seu período de migração, além da proporção da população presente capaz de entrar e passar pelo mecanismo num período de tempo aceitável.

O que se sabe a respeito deste mecanismo, no sentido da conservação, é que eles tendem a selecionar espécies, permitindo a migração apenas de algumas, o que pode causar grandes desequilíbrios tanto nas populações quanto no ecossistema (GODINHO e KYNARD, 2009). Devido a sua complexidade, duas questões interferem na ictiofauna frente as alterações ambientais causadas pelos barramentos hidrelétricos: a biologia de muitas espécies ainda permanece desconhecidas e o Brasil possui uma experiência limitada em planejamento e monitoramento de passagens de peixes (CEMIG, 2012).

Dentre as diversas medidas mitigadoras utilizadas em regiões de repovoamento, se destaca a implantação de programas de repovoamento em regiões onde foram construídos barramentos (LOPERA-BARRERO, 2016).

Porém, ressalta-se a importância do direcionamento de cruzamento dos estoques de reprodutores, além do monitoramento genético, uma vez que a redução da diversidade genética reduz a adaptabilidade das espécies nas diferentes condições ambientais e interfere na sobrevivências dos juvenis (BARROSO et al., 2005; FILHO et al., 2018).

Estudos relatam forte redução de espécies de peixes migradores no rio Sapucaí-mirim, que devido a seus hábitos de deslocamento, possuem necessidade de utilizar diferentes habitats ao longo do seu ciclo de vida, tornando-se um dos grupos mais vulneráveis (SERRA et al., 2015).

Essas espécies geralmente migram rio acima para desovar durante as estações chuvosas, produzindo um grande número de ovos pequenos. Um exemplo são as espécies do gênero *Astyanax*, que sem qualquer cuidado parental, os ovos são transportados com a corrente para os viveiros, com condições ideais para completar o seu ciclo de vida (PELICICE e AGOSTINHO, 2009). Com o bloqueio das correntes de água causadas pelos barramentos não haverá o ciclo reprodutivo por anos, levando ao esgotamento dos estoques naturais e posterior extinção de inúmeras espécies (NORMANDO et al., 2014).

Tendo em vista a intensa apropriação dos recursos fluviais pelo homem, existe uma grande necessidade de tentar identificar os impactos ambientais associados aos manejos dos corpos de água e suas consequências na diversidade e estrutura genética de peixes Neotropicais, como a espécie *Astyanax lacustris*, a fim de estabelecer medidas mitigadoras para manutenção da diversidade dos ecossistemas fluviais (ROCHA, 2012).

1.3 A espécie *Astyanax lacustris*

O gênero *Astyanax* pertence à família Characidae e compreende cerca de 154 espécies válidas que estão distribuídas nas bacias da América do Sul e Central (ESCHMEYER E FONG, 2017). No Brasil, as espécies deste gênero, são comuns e amplamente distribuídas ao longo da bacia do Paraná (GRAÇA e PAVANELLI, 2002).

Morfologicamente, as espécies pertencentes a este gênero caracterizam-se por apresentarem tamanho reduzido, linha lateral completa, pré-maxilar portátil e uma grande plasticidade fenotípica e/ou genotípicas, o que mostra uma ampla capacidade de se ajustar a diversas situações ambientais (BRITSKI et al., 1988; ORSI et al., 2002).

As espécies desse gênero ainda possuem a sua filogenia e alguns aspectos biológicos pouco esclarecidos (VALLADÃO et al., 2018). Diferentes revisões sistemáticas, na tentativa de entender as relações filogenéticas deste grupo, resultaram no estabelecimento de classificações mais apropriadas, como por exemplo a denominação *Astyanax bimaculatus*, que apresenta ampla distribuição, sendo capturados exemplares desde a Bacia do Prata até o Panamá. Observou-se que esse grupo não correspondia a uma única espécie, mas sim a um complexo de espécies (GARUTTI, 1995). Garutti e Britslik (2000) descreveram uma nova denominação para o lambari do rabo amarelo, que passou a ser *Astyanax altiparanae*. Recentemente, De Lucena e Soares (2016), passaram a reconhecer que as espécies *Astyanax jacuhiensis*, *Astyanax asuncionensis* e *Astyanax altiparanae* são novos sinônimos de *Astyanax lacustris*.

As espécies desse gênero possuem hábito de migrar no período reprodutivo para reprodução e possuem grande importância ecológica e na aquicultura (devido a suas características biológicas favoráveis para produção e cultivo), servindo ainda como iscas vivas para pesca de espécies maiores (PORTO-FORESTI et al., 2010). Além da sua importância ecológica e comercial, *Astyanax altiparanae* é um excelente modelo para estudos ecológicos, genéticos e evolutivos pois apresenta prole numerosa, gerações curtas e de fácil reprodução e manejo (LANGECKER et al., 1991; JEFFERY, 2001).

O conhecimento da composição genética e estruturação populacional de espécies como as de *Astyanax lacustris*, são de extrema importância no desenvolvimento de medidas de manejo e políticas de conservação, uma vez que são poucos os trabalhos que abordam espécies do gênero *Astyanax* em estudos genéticos populacionais, sendo esses essenciais para o desenvolvimento e melhoramento de projetos com propósitos conservacionistas, como modelo de estudo de fragmentação de populações naturais (AVISE, 2000; MENDONÇA, 2018).

1.4 Marcadores moleculares

Dentre os diversos marcadores moleculares existentes para o estudo genético de peixes Neotropicais, se destacam marcadores de microssatélites, Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) e marcadores mitocondrais (mtDNA) (FILHO et al., 2018).

Os objetivos para a utilização destes marcadores têm sido diversos. O seu uso tem auxiliado pesquisas que envolvem a caracterização molecular e identificação de espécies nos estudos biogeográficos, na produção (através do melhoramento genético), no monitoramento genético e manejo de espécies (mediante análise da variabilidade genética), na análise de *pedigree* e endogamia, na área da profilaxia (por meio do diagnóstico de doenças infecciosas, genéticas e na identificação de predisposições a doenças), na identificação genética do sexo, na análise de distância genética e reconstrução de relações filogenéticas, na identificação de indivíduos híbridos e aplicações para reconstrução de genealogias (AVISE, 2004; POVH et al., 2008).

No contexto de identificação da diversidade genética, os marcadores genéticos têm se mostrado extremamente úteis no estudo de espécies de peixes Neotropicais, buscando, inclusive, a exploração de características de interesse econômico, bem como a preservação de unidades evolutivamente significativas para a manutenção da biodiversidade da ictiofauna (RYDER, 1986; TORRES et al., 2004).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados na conservação da diversidade e estrutura genética de populações naturais de peixes estão os microssatélites (ABDUL-MUNEER, 2014).

1.4.1 Marcadores moleculares microssatélites

Dentre os diversos marcadores, existem os microssatélites ou repetições de sequências simples (SSRs), que podem ser definidos como compostos de um a seis pares de bases repetidos em *tandem* (TAUTZ, 1989). Segundo Allendorf (2017), o desenvolvimento e aplicação dos microssatélites foi a terceira maior inovação de marcadores genéticos nos estudos da conservação.

O uso deste marcador é de grande interesse para os pesquisadores, pois é considerado como um dos poucos marcadores moleculares que permitem uma visão ampla das questões ecológicas, principalmente no que se diz respeito ao estudo da diversidade e estruturação genética (SELKOE e TOONEN, 2006).

Diversos campos de estudos empregam os microssatélites, dentre eles a genética da conservação, mapeamento genético, genética forense, medicina forense, dentre outros. Essa ampla aplicação se deve a sua distribuição do genoma dos eucariotos, permitindo uma ampla análise do genoma, além de outras características como alto nível de alelos polimórficos, codominância, tamanho relativamente pequeno, herança mendeliana e alta reprodutibilidade (CHISTIAKOV, 2006).

Esse marcador é intensamente utilizado em estudos genético-populacionais em espécies de peixes, apontando estruturação ou falta delas em diversas espécies, tais como *Astyanax mexicanus* (BRADIC et al., 2012), *Pimelodus maculatus* (RIBOLLI et al., 2012) e *Salvelinus alpinus* (SAVARY et al., 2017), *Pseudoplatystoma corruscans* & *Pseudoplatystoma reticulatum* (Prado et al., 2017) *Astyanax lacustris* (MENDONÇA, 2018) Porém, um dos desafios no uso dos marcadores microssatélites mostra-se no desenvolvimento dos *primers* que são utilizados na prática de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

para a amplificação dos *loci*. Contudo, uma vez obtidos, os *primers* para uma determinada espécie podem ser empregados em outros grupos de indivíduos filogeneticamente próximos (amplificação cruzada ou transferabilidade), os custos e a mão-de-obra são reduzidos, promovendo um aumento na acessibilidade da técnica (SELKOE e TOONEN, 2006; PIORSKIET et al., 2008).

A utilização dos marcadores microssatélites constitui uma ferramenta importante para a realização de monitoramento da diversidade. Em contrapartida, são poucos os trabalhos nas bacias brasileiras que utilizam marcadores moleculares para estudos sobre a construção dos barramentos, logo, caso não ocorra um monitoramento adequado e contínuo da diversidade, muitas dessas espécies que habitam essas regiões podem desaparecer (YAKAMOTO et al., 2004; VERA et al., 2011)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como enfoque o estudo da diversidade genética e estrutura de populações de exemplares de *Astyanax lacustris* coletados no rio Sapucaí-Mirim, na bacia do alto rio Paraná, através do uso de marcadores moleculares microssatélites, servindo como base para estudos futuros de monitoramento da diversidade e estrutura de populações de peixes da região.

2.2 Objetivos específicos

Na tentativa de se entender os reais impactos causados pela construção de PCHs ao longo do curso dos rios e ressaltar a importância do monitoramento genético inicial e contínuo de populações naturais de peixes, este trabalho teve por objetivo:

1. Analisar a diversidade genética das populações de *A. lacustris* coletadas no reservatório da PCH de Palmeiras e na escada da PCH de Retiro.
2. Comparar se houve estrutura populacional dentro e entre os estoques da espécie em estudo, coletadas a montante do reservatório da PCH Palmeiras e a jusante (escada) da PCH de Retiro

Os indivíduos foram coletados no reservatório das PCH de Palmeiras (Figura 2) nos anos de 2018 e 2019 através da pesca convencional e na escada da PCH de Retiro (Figura 3) por meio de rede de arrasto, nos mesmos anos.



Figura 2. PCH de Palmeiras (reservatório evidenciado em vermelho).

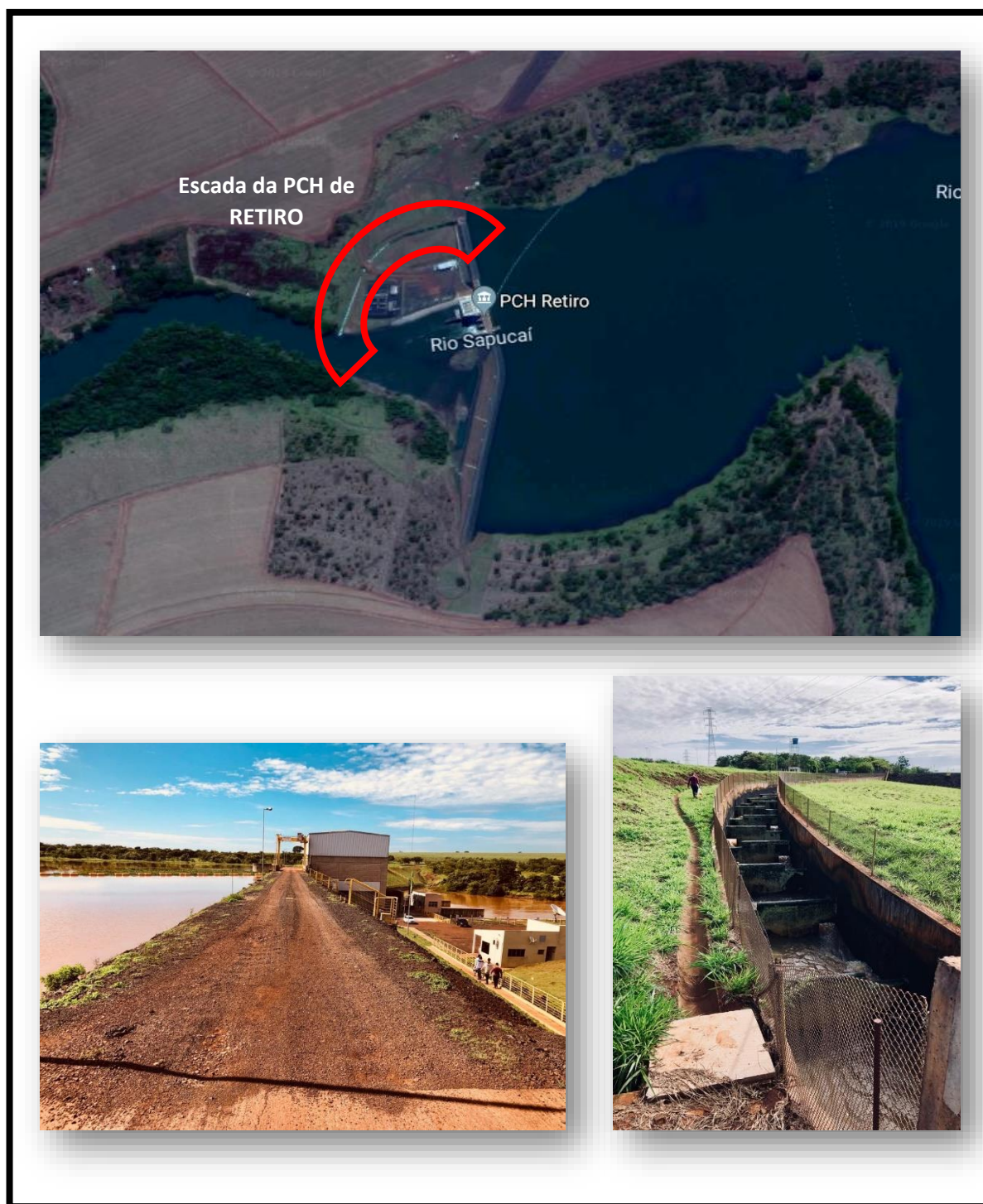


Figura 3. PCH de Retiro (escada evidenciada em vermelho).

3.2 Material biológico

Foram coletados fragmentos das nadadeiras caudais de 183 indivíduos de *A. lacustris*. Esses fragmentos foram conservados em álcool absoluto em tubos de microcentrífuga e levados ao Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE), Unesp-Bauru, São Paulo, compondo o banco de tecidos para as análises genéticas. Os indivíduos coletados nas escadas da PCH de Retiro foram encaminhados para o Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP-Jaboticabal) a fim de manter um banco de reprodutores voltados para a prática de repovoamento no rio Sapucaí-Mirim.

Dos 183 indivíduos, 87 foram coletados no reservatório da PCH de Palmeiras, a montante, e o restante (96 indivíduos) foram coletados na escada da PCH de Retiro, a jusante, no início dos anos (janeiro e fevereiro) de 2018 e 2019 (Tabela1).

Tabela 1. Ano, local e número de indivíduos coletados de *A. lacustris*

Ano	Local	Número de indivíduos
2018	Montante Reservatório da PCH de Palmeiras	42
	Jusante Escada da PCH Retiro	48
2019	Montante Reservatório da PCH de Palmeiras	45
	Jusante Escada da PCH Retiro	48



Figura 4. Exemplar de *A. lacustris* (lambari-do-rabo-amarelo).

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir de fragmentos da nadadeira caudal dos indivíduos amostrados. Foi utilizado o protocolo do *kit* comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Primeiramente, foi retirado um pequeno fragmento da nadadeira e em seguida o mesmo foi colocado em um tubo de microcentrífuga. Foi acrescentado 300 ul de *Nuclei Lysis Solution* e 4 ul de *Proteinase K* incubadas posteriormente por 2 horas em banho-maria a 60°C. Após esse período foi adicionado 4,0 ul de *RNAse* incubados por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Foram adicionados 200 ul de *Protein Precipitation Solution* e levados a temperatura de -80°C por 5 minutos. Foi seguido uma etapa de centrifugação a 13.000 rpm por 4 minutos, retirando-se o sobrenadante e transferindo para outro tubo contendo 600 ul de isopropanol. Uma nova etapa de centrifugação de 4 minutos a 13.000 rpm foi realizada, descartando novamente o sobrenadante. Foram adicionados 600 ul de etanol 70%. Novamente os tubos foram centrifugados por 4 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado.

O material foi seco em estufa a 37°C no período de 1 hora e posteriormente foram adicionados 35 µl da solução de *DNA Rehydration Solution*.

A integridade e quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com corante fluorescente GelRed™ 1X (Uniscience) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia). Para quantificação do DNA foram utilizadas um marcador padrão de peso molecular (*Low DNA mass Ladder* 100 pb - Invitrogen).

Após a extração de DNA foram aplicados marcadores moleculares microsatélites nas populações amostradas, a propósito de analisar a diversidade genética intra e interpopulacional e estrutura populacional.

Seleção e aplicação dos *loci* microsatélites

Afim de se estudar a diversidade genética e estrutura populacional de *A. altiparanae* do rio Sapucaí-Mirim foram selecionados sete *loci* microsatélites previamente descritos por Zaganini et al. (2012), levando-se em consideração critérios úteis em estudos genético populacionais, tais como: grau de polimorfismo, especificidade e a existência de alelos nulos.

Os protocolos de amplificação foram adaptados para o uso desses *loci*. Modificações nas temperaturas de anelamentos foram realizadas para otimização das reações (Tabela 3).

Para a amplificação dos microsatélites foi empregada a técnica de reação em Cadeia da Polimerase (PCR), através do uso de pares de *primers* *forward* (F) e *reverse* (R) (Tabela 2). Através das características de cada *locus*, sistemas de genotipagem foram realizados, levando-se em consideração o

tamanho (pb) de cada *locus*. Os *primers forward* (F) foram marcados na posição 5' com um dos seguintes flourocromos: PET[™], FAM[™], NED[™] e VIC[™] (Applied Biosystems). A fluorescência de cada *primer* foi desenhada de forma que os *loci* de mesmo tamanho não compartilhassem o mesmo flourocromo (Tabela 3).

A amplificação dos *loci* microssatélites foi conduzida em duas reações diferentes com apenas um par de *primers forward* (F) e *reverse* (R) separadamente. A reação para os *loci* Asty 04, Asty 15, Asty16 e Asty 23 tiveram volume final de 20 ul 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. A reação para os *loci* Asty 12, Asty 26 e Asty 27 tiveram um volume final de 25 ul, com as concentrações: 1X de Buffer; 150 uM 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* foram amplificados no termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), seguindo as condições de desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos que inclui desnaturação a 95° C por 30 segundos, temperatura de anelamento variando de 55 a 60° C por 30 segundos e extensão a 72°C por 5 minutos.

As amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador automático *ABI 3730xl DNA Analyzer* (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados no programa *GeneMapper* versão 4.0 (Applied Biosystems).

Tabela 2. Descrição dos sete loci microsstélites desenvolvidos por Zaganini et al. (2012) para *A. lacustris*.

<i>Loci</i>	<i>Sequência de cada primer</i>	<i>Repetição</i>	<i>Tamanho (pb)</i>	<i>Ta (° C)</i>
Asty 04	GGTCACTGGAGGACAGATGTT GGCATGTGCTTGAATGGA	(AC)17	200	53
Asty 12	AGACACAATCAGCCGCCGAAATG ATCCCCTCTCCACAACCCAACACA	(GT)8	163	58
Asty 15	CAACTTTTACTTAAACCTGC ATGGGTCTTTACTGCTGAATGTAT	(AC)17 – (CT)6	212	50
Asty 16	AAAGTAAAGGGCATCTGTGGAGAA AGAGGGCATCATTGTACATTTTGTG	(AC)10	165	52
Asty 23	TCAATGGAACCTATGGACAAC GTGGGAAGTAGCCTAATAAATA	(CA)12	150	57
Asty 26	CCCATTGATCCTGCCTCTAA CAGTCCTGACACAGAGAT	(GT)8	160	52
Asty 27	GCATTGTTCAGGTTGGGTCT AAACGTGGTGAGAGGGAGTG	(GT)8	190	58

(Pb) pares de bases; (Ta) Temperatura de anelamento

Tabela 3. *Loci* analisados em *Astyanax lacustris*.

Loci	Tamanho (pb)	TA (° C)	Fluorocromo	SET ABI
Asty 04	200	55	FAM	I
Asty 15	163	55	VIC	I
Asty 16	212	55	PET	I
Asty 23	165	60	NED	I
Asty 12	160	60	PET	II
Asty 26	150	60	FAM	II
Asty 27	200	60	NED	II

3.5 Análise dos dados

Após a obtenção dos dados, utilizou-se programas estatísticos a fim de se analisar a diversidade e estrutura das populações naturais.

3.5.1 *Diversidade genética e estruturação de A. lacustris*

3.5.1.1 *Diversidade genética intrapopulacional*

Para análise das frequências de alelos nulos para os *loci* em que se observou desvio dos equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) utilizou-se o programa MICRO-CHECKER 2.2.1 (Van Oosterhout et al., 2004).

Número de alelos por locus (A), heterozigosidade esperada (H_E) e heterozigosidade observada (H_O) foram estimados para observar a diversidade genética por *locus* através do programa ARLEQUÍN 3.1 (Excoffier et al., 2010).

Para a estimativa dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e do índice de fixação (F_{is}) foi empregado o programa GenePop versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). Para análise do índice de riqueza alélica (A_R) utilizou-se o programa Fstat versão 2.9.3 (Goudet, 2002).

3.5.1.2 *Diversidade genética entre populações*

Para investigação da estrutura genética entre as populações de *A. lacustris*, foram obtidos os índices de diferenciação populacional (F_{ST}) (Weir e Cockerham, 1984) através do programa ARLEQUÍN 3.1 (Excoffier et., 2010). O teste múltiplo foi conduzido com 10.000 permutações. Valores significativos (P -

value $<0,05$) foram ajustados usando a correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989).

O programa STRUCTURE 2.2.1 (PRICHARD et al., 2000) foi empregado para condução de análises de desagregação em métodos bayesianos com intuito de se investigar o número de unidades populacionais (K), utilizando os parâmetros de frequências alélicas correlacionadas, com um *burn in* de 100.000 interações seguido de um procedimento de *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) de 100.000.000 e 10 execuções independentes de $K = 1$ até $K = 10$. Os resultados obtidos pelo STRUCTURE foram processados com o programa online STRUCTURE HARVESTER 0.3 (EARL e VONHOLDT, 2012) para estimar o número ideal de K com base no método descrito por Evanno et al. 2005. Foi adquirido o modelo de ancestralidade não misturada (*no admixture model*) a propósito de permitir uma resolução máxima, uma vez que este parâmetro assume que cada indivíduo vem exclusivamente de uma das populações.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e as discussões obtidos no presente trabalho, relacionados a construções de centrais hidrelétricas no rio Sapucaí-mirim e o entendimento da estrutura e diversidade genética de populações de *A. lacustris*, serão apresentados em forma de artigo científico:

ARTIGO:

PEQUENAS CENTRAIS HIDRELÉTRICAS NO RIO SAPUCAÍ-MIRIM (SP): DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Astyanax lacustris*

Artigo

PEQUENAS CENTRAIS HIDRELÉTRICAS NO RIO SAPUCAÍ-MIRIM (SP):

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Astyanax lacustris*

Resumo

O Brasil está inserido na região Neotropical, onde se encontra a maior biodiversidade de peixes do mundo. Dentre toda essa biodiversidade, *Astyanax lacustris* merece destaque, devido a sua importância ecológica e econômica. Esta espécie é amplamente distribuída na bacia do alto rio Paraná, bacia hidrográfica que atualmente vem sendo fragmentada pela construção de inúmeras centrais hidrelétricas para produção de energia. O objetivo do presente estudo foi analisar a diversidade e estrutura genética de *A. lacustris* amostradas a jusante (escada da PCH de Retiro) e a montante (reservatório da PCH de Palmeiras) nos anos de 2018 e 2019 na região do médio Sapucaí, localizadas na bacia do alto rio Paraná, por meio de marcadores moleculares microsatélites. O Número médio de alelos por *locus* (A) variou de 16 (reservatório da PCH de Palmeiras 2018) a 17.57 (escada da PCH de Retiro 2019). A heterozigotidade observada (H_o) variou de 0.621 (escada da PCH de Retiro 2018) a 0.696 (reservatório da PCH de Palmeiras 2018) e a esperada (H_e) de 0.826 (reservatório da PCH de Palmeiras de 2019) a 0.892 (escada da PCH de Retiro). Os *loci* que apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy Weinberg foram os mesmos que apresentaram alelos nulos. Em relação a diferenciação populacional, os valores de F_{ST} variaram de 0,000 (escada da PCH de Retiro 2019 e reservatório da PCH de Palmeiras 2018) a 0,055 (escada da PCH de Retiro 2019 e escada da PCH de Retiro 2018). Os resultados de estruturação genética apresentaram $k=3$, sugerindo que dos 4 estoques estudados, três grupos foram identificados. Os dados obtidos mostram que a escada da PCH de Retiro, provavelmente, esteja formando uma barreira artificial, evidenciado pelos dois grupos geneticamente diferenciados neste local nos dois anos estudados (2018 e 2019).

Introdução

Inserida na região Neotropical, a América do Sul apresenta a fauna de peixes mais diversa do mundo (REIS, 2016). Segundo Eschmeyer e Fong (2017) o gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) abrange cerca de 154 espécies válidas. *Astyanax lacustris* popularmente conhecida como “lambari-do-rabo-amarelo”, possui grande importância tanto ecológica quanto econômica, além de servir como isca na pesca esportiva (VACARI e CASTRO, 2007; PORTO-FORESTI et al., 2010).

Esta espécie apresenta hábito migrador, ou seja, no período reprodutivo se desloca rio acima para se reproduzir, além de estar amplamente distribuída no rio Sapucaí-mirim, tributário da bacia do alto rio Paraná, região onde, paradoxalmente, vem sendo construídas inúmeras centrais hidrelétricas para produção de energia (AGOSTINHO et al., 2008). Estudos recentes nesta bacia apontam além do declínio, uma homogeneização entre as populações de peixes que ali habitam (FREITAS, 2017), além de que a sua fragmentação, pelos barramentos, é um dos principais fatores que afetam essas populações (PELICICE et al., 2017, FILHO et al., 2018).

Além da fragmentação dos rios, outros impactos são observados pela construção dos barramentos, tais como mudanças biogeoquímicas, perda e degradação de habitats, introdução de espécies não-nativas e perda da conectividade (PRINGLE et al., 2000; NESTLER et al., 2012; DAGA et al., 2015; AGOSTINHO et al., 2016).

Uma das ferramentas genéticas utilizadas atualmente na determinação e conservação da diversidade e da estrutura genética de populações naturais

peixes, são os marcadores moleculares microssatélites (ABDUL-MUNNER, 2014). Microssatélites ou Sequências Simples Repetitivas (SSRs) são amplamente utilizados, principalmente devido a sua abundância no genoma dos eucariotos, codominância e alta reprodutibilidade (GROVER e SHARMA et al., 2016).

Estudos genético-populacionais para *A. lacustris*, em diversos rios da bacia do alto rio Paraná, utilizando esses marcadores, têm-se demonstrado extremamente eficazes para o estudo da diversidade e estrutura genética, como feito por Ferreira et al. (201) e por Mendonça (2017)

Uma vez que a construção de barragens para a geração de energia elétrica constitui uma das alterações antrópicas mais frequentes nos rios brasileiros e estudos sobre monitoramento da diversidade e estrutura genética inicial e contínuo das populações de peixes Neotropicais são escassos, este trabalho teve por objetivo analisar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *A. lacustris*, por meio de marcadores microssatélites, de indivíduos coletados a montante (reservatório da PCH de Palmeiras) e a jusante (escada da PCH de Retiro) na região do médio Sapucaí, bacia do rio alto Paraná.

Material e métodos

Foram coletados fragmentos das nadadeiras caudais de 183 indivíduos de *A. lacustris*. As amostras foram conservadas em álcool absoluto afim de se manter sua integridade e qualidade. Elas foram capturadas no trecho Médio Sapucaí (tributário da bacia do alto rio Paraná), nas escadas da PCH de Retiro

nos meses de janeiro e fevereiro dos anos de 2018 e 2019 e no reservatório da PCH de Palmeiras no mesmo período.

Dos 183 indivíduos, 87 foram coletados nos anos de 2018 e 2019 no reservatório da PCH de Palmeiras, a montante, e o restante (96 indivíduos) foram coletados na escada da PCH de Retiro, a jusante, nos mesmos anos (Tabela1).

Tabela 1. Ano, local e número de indivíduos coletados de *A. lacustris*.

Ano	Local	Número de indivíduos
2018	Montante Reservatório da PCH de Palmeiras	42
	Jusante Escada da PCH Retiro	48
2019	Montante Reservatório da PCH de Palmeiras	45
	Jusante Escada da PCH Retiro	48

Posteriormente foi realizada a extração do DNA, a partir de fragmentos da nadadeira caudal dos indivíduos amostrados. Foi utilizado o protocolo do *kit* comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). A integridade e quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com corante fluorescente GelRed™ 1X (Uniscience) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia).

Foram aplicados marcadores microssatélites nas populações amostradas previamente descritos por Zaganini et al. (2012) (Anexo 1). Os *primers forward*

(F) foram marcados na posição 5' com os seguintes fluorocromos: PET[™], FAM[™], NED[™] e VIC[™] (Applied Biosystems) (Tabela 3).

Tabela 3. *Loci* analisados em *Astyanax altiparanae*.

Loci	Tamanho (pb)	TA (° C)	Fluorocromo	SET ABI
Asty 04	200	55	FAM	I
Asty 15	163	55	VIC	I
Asty 16	212	55	PET	I
Asty 23	165	60	NED	I
Asty 12	160	60	PET	II
Asty 26	150	60	FAM	II
Asty 27	200	60	NED	II

A amplificação dos *loci* microssatélites foi conduzida em duas reações diferentes com apenas um par de *primers forward* (F) e *reverse* (R) separadamente. A reação para os *loci* Asty 04, Asty 15, Asty16 e Asty 23 tiveram volume final de 20 µl com as seguintes concentrações: 1,4X Buffer; 94 µM de dNTPs; 3,12 mM de MgCl₂; 205 mM de cada *primer*; 0,25 U de Taq e 10-30 ng de DNA. A reação para os *loci* Asty 12, Asty 26 e Asty 27 tiveram um volume final de 25 µl, com as 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* foram amplificados no termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), seguindo as condições de desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos que inclui desnaturação a 95° C por 30 segundos, temperatura de anelamento variando de 55 a 60° C por 30 segundos e desnaturação a 72° C por 5 segundos e extensão final a 72° C por 5 minutos.

As amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador automático *ABI 3730xl DNA Analyzer* (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados no programa *GeneMapper* versão 4.0 (Applied Biosystems). Após a obtenção dos dados, utilizou-se programas estatísticos a fim de se analisar a diversidade e estrutura das populações naturais.

Número de alelos por locus (A), heterozigosidade esperada (H_E) e heterozigosidade observada (H_O) foram estimados através do programa ARLEQUÍN 3.1 (EXCOFFIER et al., 2010). Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e do índice de fixação (F_{IS}) foi empregado o programa GenePop versão 3.4 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Para análise do índice de riqueza alélica (A_R) utilizou-se o programa Fstat versão 2.9.3 (GOUDET, 2002). Para análise das frequências de alelos nulos para os *locus* em que se observou desvio dos equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) utilizou-se o programa MICRO-CHECKER 2.2.1 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004)

Para investigação da estrutura genética entre as populações de *A. lacustris*, foram obtidos os índices de diferenciação populacional (F_{ST}) (WEIR e COCKERHAM, 1984) através do programa ARLEQUÍN 3.1 (Excoffier et., 2010). O teste múltiplo foi conduzido com 10.000 permutações. Valores significativos

(P -value < 0,05) foram ajustados usando a correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989).

O programa STRUCTURE 2.2.1 (PRICHARD et al., 2000) foi empregado para condução de análises de desagregação em métodos bayesianos com intuito de se investigar o número de unidades populacionais (K), utilizando os parâmetros de frequências alélicas correlacionadas, com um *burn in* de 100.000 interações seguido de um procedimento de *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) de 100.000.000 e 10 execuções independentes de $K = 1$ até $K = 10$. Os resultados de STRUCTURE foram processados com o programa online STRUCTURE HARVESTER 0.3 (EARL e VONHOLDT, 2012) para estimar o número ideal de K com base no método descrito por Evanno et al. 2005. Foi adquirido o modelo de ancestralidade não misturada (*no admixture model*) a propósito de permitir uma resolução máxima, uma vez que este parâmetro assume que cada indivíduo vem exclusivamente de uma das populações.

Resultados

Diversidade genética intrapopulacional

No total foram genotipadas 183 amostras de indivíduos de quatro grupos de *A. lacustris* nos anos de 2018 (**MONTANTE** e **JUSANTE**) 2019 nas mesmas localizações do ano anterior. Os sete *loci* utilizados mostraram-se polimórficos. O estoque da **JUSANTE 2018** apresentou valores médios de número de alelos por locus (A) de 17.5, riqueza alélica (A_r) de 12.50, heterozigosidade observada (H_o) de 0.621, heterozigosidade esperada (H_E) de 0.838 e índice de fixação (F_{IS}) de (0.212). O grupo amostrado na **MONTANTE** do mesmo ano, apresentou

valores médios de número de alelos por locus (A) de 16, riqueza alélica (A_r) de 15.80, heterozigosidade observada (H_o) de 0.696, heterozigosidade esperada (H_E) de 0.892 e índice de fixação (F_{IS}) de (0.142).

No ano seguinte (2019), a população da **JUSANTE** apresentou valores médios de número de alelos por locus (A) de 17.57, riqueza alélica (A_r) de 16.79, heterozigosidade observada (H_o) de 0.685, heterozigosidade esperada (H_E) de 0.839 e índice de fixação (F_{IS}) de (0.171). O grupo amostrado na **MONTANTE** do mesmo ano apresentou valores médios de número de alelos por locus (A) de 17.42, riqueza alélica (A_r) de 17.86, heterozigosidade observada (H_o) de 0.692, heterozigosidade esperada (H_E) de 0.826 e índice de fixação (F_{IS}) de (0.145). Todos os valores médios citados acima estão inseridos na tabela 3.

Os loci *Asty 15* e *Asty 26* apresentaram em todas populações estudadas os maiores valores de número de alelos por locus (A) enquanto os loci *Asty 12* e *Asty 27* apresentaram os menores valores. Em relação as heterozigosidades, com exceção a **JUSANTE 2018**, o loci *Asty 26* apresentou os maiores valores de heterozigosidade esperada e observada (H_E e H_o) nas demais populações. Os menores valores foram observados nos loci *Asty 12* e *Asty 16*, também com exceção a **JUSANTE 2018**. Todos os valores estão expostos nos apêndices (1 a 4).

Desvios significativos do EHW e valores positivos significativos do índice de endogamia (F_{IS}) ($P < 0.007$, após a correção de Bonferroni) foram observados em todas as populações para o locus *Asty 16*. Na população da **JUSANTE 2018**, além *Asty 16* os loci *Asty 15* e *Asty 26* também apresentaram desvios significativos (Apêndice 1). Os loci *Asty 04* e *Asty 15* também apresentaram desvios significativos no estoque **JUSANTE 2019** (Apêndice 2). Na **MONTANTE**

2018 observou-se desvios significativos também no *Asty* 04 e *Asty* 23 (Apêndice 3). No caso da **MONTANTE 2019**, os desvios significativos foram encontrados também nos loci *Asty* 26 e *Asty* 27 (Apêndice 4).

Ao comparar a diversidade genética entre os anos (2018 e 2019), observou-se que **JUSANTE 2019** apresentou maior diversidade genética relação a **JUSANTE 2018** ($A = 17.57$; $Ar = 16.79$; $H_E = 0.839$ e $A = 17.5$; $Ar = 12.50$; $H_E = 0.839$, respectivamente. Na **MONTANTE 2019**, uma maior diversidade genética foi observada quando comparada a mesma localização do ano anterior (**MONTANTE 2018**) ($A = 14.42$; $Ar = 17.86$; $H_E = 0.826$ e $A = 16$; $Ar = 15.80$; $H_E = 0.892$, respectivamente).

Tabela 3. Diversidade alélica dos sete loci microsatélite aplicados em *A. altiparanae* nos anos de 2018 e 2019 nos reservatórios da PCH de Palmeiras (MONTANTE) e nas Escadas da PCH de Retiro (JUSANTE) nos mesmos anos.

	2018		2019	
	JUSANTE	MONTANTE	JUSANTE	MONTANTE
<i>N</i>	48	42	48	45
<i>A</i>	17.5	16	17.57	17.42
<i>Ar</i>	12.50	15.80	16.79	17.86
<i>H_o</i>	0.621	0.696	0.685	0.692
<i>H_E</i>	0.838	0.892	0.839	0.826
<i>F_{IS}</i>	0.212	0.142	0.171	0.145

N - número amostral; *A* - número de alelos por locus; *Ar* - riqueza alélica; *H_o* - heterozigosidade observada; *H_E* - heterozigosidade esperada; *F_{IS}* - índice de endogamia.

Diversidade genética interpopulacional

Os valores de F_{ST} variaram de 0.000 (**JUSANTE 2019** e **MONTANTE 2018**) a 0.055 (**JUSANTE 2019** e **JUSANTE 2018**). Ao comparar os estoques, observou-se valores significativas ($P < 0,05$) entre o grupo coletado a montante no ano de 2019 e na mesma localização do ano anterior [$f_{st} = 0.023$]. Valores

significativos também foram encontrados a montante no ano de 2019 e a jusante (Escada da PCH de Retiro) do mesmo ano [$f_{st}=0.022$]

Valores altamente significativos ($P<0.001$) foram encontrados entre a jusante no ano de 2018 e todos os outros grupos amostrados neste trabalho (**JUSANTE 2018** e **MONTANTE 2018** [$f_{st}=0.050$] , **JUSANTE 2018** e **MONTANTE 2019** [$f_{st}=0.054$], **JUSANTE 2018** e **JUSANTE 2019** [$f_{st}=0.055$]). Por fim, quando comparado **JUSANTE 2019** e **MONTANTE 2018**, pode-se observar que a diferenciação entre os grupos não foi significativa [$f_{st}=0,000$]. Todos valores citados anteriormente estão expostos na tabela 4.

Tabela 4. Valores de F_{ST} de populações de *A. altiparanae* entre as quatro populações amostradas.

	MONTANTE 2018	MONTANTE 2019	JUSANTE 2018	JUSANTE 2019
MONTANTE 2018	-			
MONTANTE 2019	0.023	-		
JUSANTE 2018	<u>0.050</u>	<u>0.054</u>	-	
JUSANTE 2019	0.000	0.022	<u>0.055</u>	-

Em negrito valores considerados significativos ($P<0.05$), em negrito e sublinhado, valores considerados altamente significativos ($P<0.001$), 10.100 permutações.

A análise de identificação de grupos de populações utilizando o programa STRUCTURE HARVESTER indicou $K=3$, mostrando que o grupo coletado na jusante no ano de 2019 e na jusante 2018 formaram dois grupos diferenciados geneticamente. O outro grupo formado, corresponde aos grupos coletados na montante em 2018 e 2019. Podemos observar as semelhanças e diferenças genotípicas dos grupos amostrados no *tree plot* e nos *bar plots* obtidos pelo programa STRUCTURE.

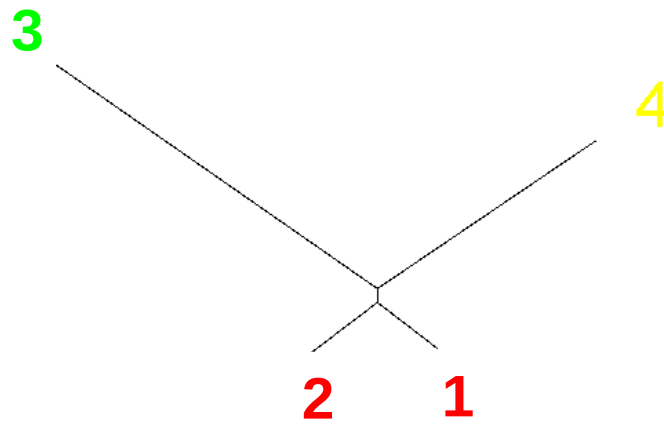


Figura 1. *Neighbor Join Tree* das populações de *A. lacustris*, estimadas pelo programa STRUCTURE utilizando K = 4. Cada cor e número indica um grupo analisado com base nas suas semelhanças genotípicas. O número 1 representa MONTANTE 2018, o 2 MONTANTE 2019, o 3 JUSANTE 2018 e o 4 JUSANTE 2019.

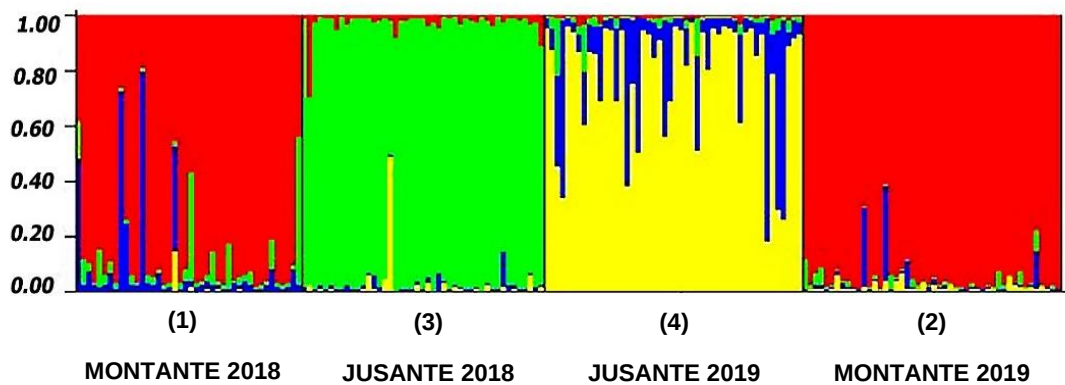


Figura 2. Estrutura bar plot das populações de *A. lacustris*, estimadas pelo programa STRUCTURE utilizando K = 4. Cada cor indica e número um grupo analisado com base nas suas semelhanças genotípicas..

DISCUSSÃO

Diversidade genética intrapopulacional

Diversos estudos apontam que a fragmentação da bacia do rio Paraná, principalmente a região do alto Paraná, através das construções de centrais hidrelétricas, estão levando a um declínio e a uma homogeneização genética nas populações de peixes (SIVASNUNDAR et al., 2001; FREITAS, 2017). Logo, o monitoramento da diversidade genética das espécies que ali habitam são de extremamente importância na conservação das mesmas.

A diversidade genética em populações pode ser medida pelo número de alelos e heterozigosidade. A variabilidade intrapopulacional é influenciada por fatores como mutação, deriva genética e seleção natural (JUANES et al., 2007). Neste trabalho, notamos que todos os grupos estudados (**JUSANTE 2018**, **JUSANTE 2019**, **MONTANTE 2018** e **MONTANTE 2019**) apresentaram, de maneira geral, uma alta diversidade genética. Valores similares para *A. lacustris* foram encontrados por Mendonça (2017) na mesma região, por Zaganini (2013) em diferentes rios da bacia do alto Paraná e por Ferreira et al. (2016).

Desvios das frequências genotípicas do Equilíbrio de Hardy Weinberg podem indicar se forças evolutivas como seleção natural, deriva genética, mutação ou migração estão agindo nas populações naturais. Pereira et al., (2008) ressalta cinco potenciais causas que podem ocasionar desvios significativos do Equilíbrio de Hardy Weinberg: alto número de alelos por *locus*, ocorrência de alelos nulos, grande perda de alelos, efeito Wahlund e endogamia.

De todas as possíveis causas citadas acima, a presença de alelos nulos são as mais comuns quando se utiliza marcadores microsatélites (SELKOE e

TOONEN; 2006). Zaganini et al. (2012), quem descreveu esses marcadores, relatou a presença de alelos nulos apenas nos *loci* *Asty* 16 e *Asty* 21, sendo que o último marcador foi excluído das análises deste trabalho. A presença de alelos nulos no *locus* *Asty* 16 foi encontrada em todos os grupos que apresentaram excesso de homozigotos e desvios do Equilíbrio de Hardy Weinberg.

A alta diversidade genética de *A. lacustris* observada nos quatro grupos amostrados foi esperada, uma vez que a construção de ambas PCHs é muito recente, com o início de suas operações ainda nessa década. Além disso, podemos notar um outro fator que possa ter contribuído pela manutenção da diversidade: a capacidade de adaptação dessa espécie a diferentes ambientes, incluindo o seu potencial de migração, seus aspectos reprodutivos e manutenção de grandes populações (LEUZZI et al., 2004). Zaganini (2012) também cita em seu trabalho que as populações de *A. lacustris* da bacia do rio Paraná possuem uma alta variabilidade genética, provavelmente por causa da sua história evolutiva e de suas características ecológicas, como citado anteriormente.

Uma outra causa relacionada que possa também estar influenciando a manutenção da diversidade genética dessas populações, são as práticas de repovoamento que são realizadas na região do médio Sapucaí, por meio de práticas de *suportive breeding*. Esta prática conservacionista consiste no acasalamento de indivíduos geneticamente distantes, com intuito de diminuir as taxas de endogamia.

O entendimento da diversidade genética é fundamental nos estudos da biologia da conservação. Questões como evolução das populações às respostas ambientais, principalmente relacionados aos efeitos das ações antrópicas nos

ambientes naturais, podem ser respondidas com auxílio do monitoramento contínuo da diversidade genética dessas populações.

Diversidade genética interpopulacional

Diversos estudos de estruturação de peixes Neotropicais, utilizando marcadores microssatélites, concentram-se nas populações afetadas pelas construções de barragens e muitos deles indicam que populações naturais já sofrem os seus efeitos (FILHO et al., 2018).

No presente estudo, as análises de diferenciação populacional (F_{ST}) corroboraram com os valores obtidos pelo programa STRUCTURE, que indicou $K=3$. Esses dados mostram que os grupos coletados a montante do médio Sapucaí (**MONTANTE 2018** e **2019**) formam uma única população e que as suas características genotípicas diferem do grupo coletado a jusante no ano de 2018, e que diferem também do grupo coletado na mesma região no ano seguinte (**JUSANTE 2019**), que por conseguinte, acabou resultando em uma outra população.

O fato de os grupos coletados nos anos de 2018 e 2019, a jusante, apresentarem diferenciação genética, mesmo que classificadas como pequena a moderada, segundo Wright (1978), pode ser justificado pelo fato de que a cada ano novas populações migram rio acima no período de reprodução, evidenciando que a escada da PCH de Retiro possa estar sofrendo influência de outras populações de lambaris localizadas a baixo da escada da PCH de Retiro, onde curiosamente não há construções de PCHs. Além do mais, Garutti (1995) afirma que espécies do gênero *Astyanax* possui uma distribuição

compartimentalizada, sugerindo até um certo grau de endemismo, ou seja, pode haver diferenças dentro e entre bacias, mas ainda assim existe a necessidade de migrar rio acima para se reproduzir.

Os dados obtidos são semelhantes com as informações encontradas por Mendonça (2018) que também observou diferenciação populacional significativa em grupos de indivíduos de *A. lacustris* coletados nas escadas da PCH de Retiro no ano de 2015 com populações amostradas nos reservatórios da mesma PCH em três anos consecutivos (2015, 2016, 2017).

Os sistemas de Transposição de Peixes (STPs) que são atualmente implantados no Brasil, como por exemplo as escadas, são daqueles que fornecem movimentos apenas da jusante para a montante (CEMIG, 2013), o que pode explicar o fato dos resultados apresentados apontarem que os grupos coletados à montante nos anos de 2018 e 2019 apresentam características genotípicas semelhantes, indicando a formação de uma única população no reservatório da PCH de Palmeiras.

Os reservatórios são resultado da construção das centrais hidrelétricas. Esse novo ambiente sofre rápidas e intensas modificações, pois o ambiente que era anteriormente lótico, com fluxo intenso de água, passa a ser semi-lêntico ou lêntico (AGOSTINHO et al., 2008). Uma das consequências da formação dos reservatórios, é que como os indivíduos não conseguem migrar novamente para jusante após o período de reprodução, eles acabam “presos” nesses grandes lagos artificiais, formando um único grupo com características genotípicas semelhantes, o que deve ter acontecido com os estoques de *A. lacustris* analisadas na montante nos anos de 2018 e 2019. O aumento da frequência de acasalamentos consanguíneos (endogamia) é outra consequência

que tende a ocorrer ao longo dos anos, podendo levar ao surgimento de depressão endogâmica, caracterizada pela perda de valor adaptativo médio populacional em função do aumento da frequência de homozigotos para alelos deletérios ou letais (YAZBECK, 2007).

Logo, ressalta-se a importância do monitoramento contínuo dessas populações, como medida mitigadora na tentativa de se atenuar os efeitos causados pelos barramentos, pois as informações sobre a diversidade genética e estruturação de populações naturais são fundamentais para determinar como essas espécies possam ser conservadas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil a maior parte da produção e transmissão de energia elétrica é proveniente, com forte predominância, de usinas hidrelétricas. A bacia do alto rio Paraná, formada pela junção do rio Grande e Parnaíba, é uma das maiores bacias do mundo, abrangendo uma área de 4.694 km² com área de drenagem de 2.8 x 10 km². Paradoxalmente, a produção de energia hidrelétrica é uma das atividades antrópicas que mais afetam as vidas dos peixes nos rios.

O monitoramento genético, utilizando marcadores moleculares, é uma ferramenta fundamental para compreensão da diversidade e estrutura genética de populações naturais, principalmente de regiões onde há construções de centrais hidrelétricas.

O presente trabalho visou analisar a diversidade e estrutura genética de estoques de *A. lacustris* coletadas nas mesmas regiões por dois anos consecutivos (2018 e 2019), levando em consideração a importância dessa espécie não só na região do médio Sapucaí, como em toda bacia do alto rio Paraná. As regiões escolhidas foram o reservatório da PCH de Palmeiras (montante) e a escada da PCH de Retiro (jusante) afim de comparar anual e temporalmente os estoques.

De maneira geral, pôde-se concluir que os marcadores microsatélites escolhidos para as análises se mostram eficientes e que os quatro grupos apresentaram uma alta diversidade genética, independente do ano e da localização que foram coletados, o que pode ser justificado pelas técnicas de *supportive breeding* que vem sendo realizada na região, pela sua recente construção (de ambas PCHs), além da capacidade dos indivíduos dessa espécie a se adaptar a ambientes hostis.

No que se diz respeito às análises de estruturação populacional, notamos que os resultados de diferenciação mostram 3 grupos: um grupo no reservatório de Palmeiras e dois na escada de Retiro: uma em 2018 e outra em 2019. Isso aconteceu, provavelmente, por ambas PCHs apenas possuírem escadas para transposição de peixes no sentido jusante/montante, e não ao contrário, auxiliando apenas a subida dos peixes para reprodução.

Por fim, ressalta-se a importância da execução de medidas mitigadoras, desde as construções de escadas, mesmo que permita o indivíduo migrar rio acima, até a reposição contínua de estoques provenientes de técnicas de *supportive breeding* em ambientes afetados por ações antrópicas. Este trabalho servirá como base para futuros trabalhos de diversidade e estrutura genética de populações de peixes Neotropicais, uma vez que esses tipos de estudos são escassos no Brasil.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International*. 2014: 11
- Agostinho, A. A., Júlio-Jr, H. F. Peixes da bacia do alto Paraná. (1999). In: Lowe-McConnell, R. H. (Orgs.). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Tradução: Vazzoler, A. E. A. M., Agostinho, A. A., Cunningham, P. T. M. São Paulo: EDUSP. 374-399.
- Agostinho, A. A., Gomes, L. C., Latini, J. D. (2004). Fisheries management in Brazilian reservoir: lessons from/for South America. *Interciência*. 29(6): 334-338.
- Agostinho, A. A., Gomes, L. C., Pelicice, F. M. (2007) Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá: EDUEM, Maringá. (6): 227- 381.
- Allendorf, F. W. (2017) Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Molecular Ecology*. 26: 420-430.
- Arrington, D. A., Davidson B. K., Winemiller K. O., Layman C, A. (2006). Influence of life history and seasonal hydrology on lipid storage in three neotropical fish species. *Journal of Fish Biology*. 68: 1347-1361.
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. London: Harvard University Press.
- Avice, J. C. (2004). *Molecular markers, natural history and evolution molecular markers*. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates; Inc. Publishers. 475-540.
- Barroso, R. M., Hilsdor, A. W. S., Moreira, H. L. M., Cabello, P. H., Traub-Cseko, Y. M. (2005). Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. *Aquaculture*. 247:51-65.
- Britski, H. A., Sato, Y., Rosa, A. B. S. (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Ministério da Irrigação – CODEVASF. 3: 115.

- Buckup, P. A., Menezes, N. A., Ghazzi, M. S. (2007) Catálogo dos peixes marinhos de água doce do Brasil. Série livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Carvalho, Fernando R., Langeani, Francisco. (2013). *Hyphessobrycon uaiso*: new characid fish from the rio Grande, upper rio Paraná basin, Minas Gerais State (Ostariophysi: Characidae), with a brief comment about some types of *Hyphessobrycon*. Neotropical Ichthyology. 11(3): 525-536.
- Cesário, V. V. Estudo sobre a ictiofauna do rio Sapucaí-Mirim, afluyente da margem esquerda do Rio Grande no estado de São Paulo: Composição, distribuição espacial e sazonalidade. (2010). Tese de Ecologia e Recursos Naturais – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- Comitê da Bacia Hidrográfica do rio Sapucaí – CBH Sapucaí. (2018). <http://www.cbhsapucaia.org.br/cbh/Pagina.do;jsessionid=13gn7tajxu7lu?idSecao=15>. Acessado 10 de agosto de 2019.
- Cowx, I. G. (2002). Analysis of threats to freshwater fish conservation: past and present challenges. In: Collares-Pereira MJ, Coelho MM Conservation of freshwater fishes: options for the future, Fishing News Books, Blackwell Science. 201.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B, & Volckaert, F. A. M. (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. Aquaculture. 255(1-4): 1–29.
- Crook, D. A., Lowe, W. H., Allendorf, F. W., Eros, T., Finn, D. S., Gillanders, B. M., Hughes, J. M. (2015). Human effects on ecological connectivity in aquatic ecosystems: Integrating scientific approaches to support management and mitigation. Science of the Total Environment. 534: 52–64.
- De Lucena, C. A. S., Soares, H. G. (2016). Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. Zootaxa. 4072 (1): 101-125.
- Do Prado, F. D., Fernández- Cebrián, R. Foresti, F., Oliveira, Oliveira, C., Martínéz, P., Porto-Foresti, F. (2017). Genetic structure and evidence of

- anthropogenic effects on wild populations of two Neotropical catfishes: baselines for conservation. *Journal of Fish Biology*. 1-18.
- Eschmeyer, W. N., Fong J. D. (2017). Species by Family/Subfamily. Electronic version in: research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.a.sp.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of cluster of individuals using the software structure: Assimilation study. *Molecular Ecology*.14: 2611-2620.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs populations genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Ferreira, D. G., Lima, S. C., Fantine-Silva, W., Silva, j. F., Apolinário-Silva, C., Sofia, S. H., Carvalho, S. Galindo, B. A. (2016). Fine-scale genetic structure patterns in two freshwater fish species, *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes, Cichidae) and *Astyanax altiparanae* (Osteichthyes, Characidae) throughout a Neotropical stream. *Genetics and Molecular Research*. 15 (4): 1-15.
- Filho, V. A. M., Freitas, M. V., Ariede, R. B., Lira, L. V. G., Mendes, N. J., Hashimoto, D. T. (2018). Genetic applications in the conservation of neotropical freshwater fish. p. 249-283. In: IntechOpen. 12 ed.
- Freitas, M. V. (2017). Análise do DNA mitochondrial como subsídio para o pré-melhoramento genético do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Dissertação de Mestrado. Centro de Aquicultura. Jaboticabal, Brasil: Universidade Estadual Paulista.
- Garutti, V. (1995). Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mavha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônia. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Paulista, São José do Rio Preto.
- Garutti, V., Britski, H. A. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Telostei, Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre

- as demais espécies do gênero da bacia. Comunicação do Museu de Ciência e Tecnologia da PUC-RS. 13: 65-88.
- Goldinho, A. L., Kynard, B. (2009). Migratory fishes of Brazil: life history and fish passage needs. *River Research and Applications*. 25: 702-712.
- 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).
- Graça, W. J. Pavanelli, C. S. (2002). *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Osteichthyes, Characidae) in the Iguaçu River basin. *Biological Sciences*. 24: 451–453.
- Groover, A. Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*. 36 (2): 290-302.
- Hales, J., Petry, P. *Freshwater Ecoregions of the World*. (2006). <http://www.feow.org/ecoregions>. Acessado em 28 de Agosto de 2019.
- Jeffery, W. R. (2001). Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Developmental Biology*. 231: 1-12.
- Juanes F, Perez J, Garcia-Vazquez E. (2007). Reproductive strategies in small populations: Using Atlantic salmon as a case study. *Ecology of Freshwater Fish*. 16 (4): 468-475.
- Langeani, F., Correa, R. M C., Oyakawa, O. T., Shibatt, O. A., Pavanelli, C. S., Casatti, L. (2007). Diversidade da ictiofauna do Alto Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*. 7 (3): 181- 197.
- Langecker, T. G., Wilkens, H., Junge, P. (1991). Introgressive hybridization in the Pachon cave population of *Astyanax fasciatus*. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 2: 209-212.
- Leuzzi, M. S. P., Almeida, F. S., Orsi., M. L., Sodri, L. M. K. (2004). Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular*. 27(3): 355-362.
- Lopera-Barrero, N. M., Santos, S. C. A., Goes, E. S. R., Castro, P. L., Souza, F. P., Poveda-Parra, A. R., Casseta, J., Pontilho, B.G., Ribeiro, R. P. (2016). Monitoramento e conservação genética de populações naturais de *Prochilodus lineatus* dos rios Pardo, Mogi-Guaçu e Tietê, São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 68 (6): 1621-1628.

- Lowe-McConnell, R., H. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Editora Universidade de São Paulo. 534.
- Mendonça, B. B. (2018). 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.
- Normando, F. T., Santiago, L.B., Gomes, M. V. T., Rizzo, E., Nilo, B. (2014). Impact of the Três Marias dam on the reproduction of the forage fish *Astyanax bimaculatus* and *A. fasciatus* from São Francisco River, downstream from the dam, southeastern, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*. 97: 307-319.
- Orsi, M. L., Shibatta, O. A., Silva-Souza, A. T. (2002). Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis, p. 425-432. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (Eds). A bacia do rio Tibagi, Londrina, UEL.
- Pelice, F. M., Azevedo-Santos, V. M., Vitule, J. R. S., Orsi, M. L., Lima-Junior, D. P., Magalhães, A. L. B., Pompeu, P. S., Jr, M. P., Agostinho, A. A. (2017). Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. *Fish and Fisheries*. 18: 1119-1133.
- Pelice, F. M., Agostinho, A. A. (2009). Fish fauna destruction after the introduction of a non-native predator (*Cichla kelberi*) in a neotropical reservoir. *Biological Invasions*. 11: 1789-1801.
- Pereira, L. H. G., Foresti, F., Oliveira, C. (2009). Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. *Ecology of Freshwater Fish*. 18: 215-255.
- Piorski, N.M., Sanches, A., Carvalho-Costa, L. F., Hatanaka, T., Carrillo-Avila, M., Freitas, P. D., Galetti, P. M. (2008). Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Brazilian Journal of Biology*. 1039–1050.
- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F. (2010). Híbridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas. In: Baldissotto B, Gomes LC, editors. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Santa Maria, Brazil: Editora UFSM. 589-606.

- Povh, J. A., Lopera-Barrero, N. M., Ribeiro, R. P., Lupchinski Jr, E., Gomes P, C., Lopes, T. S. (2008). Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia E Investigación Agraria*. 35(1), 5–15.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population Structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155 (2):945–59.
- Raymod. M., Rousset, F. (1995). GENEPOP 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*. 86: 248-249.
- Reis, R. E., Albert, J. S., Didario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., Rocha, L. A. (2016) Fish biodiversity and conservation in South América. *Journal of Fish Biology*. 89 (1): 12-47.
- Ribolli J, de Melo, C. M. R, e Zaniboni-Filho E. (2012). Genetic characterization of the neotropical catfish *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) in the Upper Uruguay River. *Genetics and Molecular Biology*. 35(4): 761–769.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing table of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225.
- Rocha, P. C. O regime de fluxo dos rios Aguapeí e Peixe, bacia do alto Paraná/Brasil: Alterações e formas de impacto. (2012). XII Encuentro de Geógrafos de América Latina.
- Savary, R., Dufresnes, C., Champigneulle, A., Caudron, A., Dubey, S., Perrin N, Fumagalli, L. (2017). Stocking activities for the Arctic charr in Lake Geneva: Genetic effects in space and time. *Ecology and Evolution*. 7(14): 5201–5211.
- Selkoe, K.A., Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9(5): 615–629.
- Sivasundar, A., Bermingham, E. Orti, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*. 10: 407-417.
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Pilarski, F. (2018). South America fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 10: 351-369.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. (2004). MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors

in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, September, v. 4, n. 3, p. 535-53.

- Vari, R. P., Castro, R. M. C. (2007). New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. *Copeia* 2007(1):150-162.
- Weir, B. S., Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358-1370.
- Zaganini, R. L., Hashimoto, D. T., Henrique, L., Pereira, G. (2012). Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei : Characiformes) and cross-species amplification. *Indian Academy of Sciences*. 91: 24–27

7 ANEXOS

Anexo 1

Descrição dos sete loci microsstélites desenvolvidos para *A. lacustris* por Zaganini et al. (2012).

<i>Loci</i>	Sequência de cada <i>primer</i>	Repetição	Tamanho (pb)	Ta (° C)
Asty 04	GGTCACTGGAGGACAGATGTT GGCATGTGCTTGAATGGA	(AC)17	200	53
Asty 12	AGACACAATCAGCCGCCGAAATG ATCCCCTCTCCACAACCCAACACA	(GT)8	163	58
Asty 15	CAACTTTTACTTAAACCTGC ATGGGTCTTTACTGCTGAATGTAT	(AC)17 – (CT)6	212	50
Asty 16	AAAGTAAAGGGCATCTGTGGAGAA AGAGGGCATCATTGTACATTTTGTG	(AC)10	165	52
Asty 23	TCAATGGAACCTATGGACAAC GTGGGAAGTAGCCTAATAAATA	(CA)12	150	57
Asty 26	CCCATTGATCCTGCCTCTAA CAGTCCTGACACAGAGAT	(GT)8	160	52
Asty 27	GCATTGTTTCAGGTGGGTCT AAACGTGGTGAGAGGGAGTG	(GT)8	190	58

8 APÊNDICES

Apêndice 1

Diversidade alélica dos sete *loci* microssatélites aplicados em populações de *Astyanax lacustris* na **Escada de Retiro em 2018**.

<i>Locus</i>	<i>A</i>	<i>Ar</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>
Asty 04	17	13.62	0.690	0.902	0.236
Asty 12	10	6.94	0.583	0.513	-0.139
Asty 15	29	17.81	0.674	0.922	0.271*
Asty 16	13	13.00	0.632	0.925	0.322*
Asty 23	13	10.83	0.717	0.851	0.158
Asty 26	18	13.48	0.489	0.915	0.468*
Asty 27	10	11.85	0.567	0.840	0.172

A – número de alelos por locus; *Ar* – riqueza alélica; *H_O* – heterozigosidade observada; *H_E* – heterozigosidade esperada; *F_{IS}* – índice de fixação; * *F_{IS}* com valores significativos após a correção de Bonferroni.

Apêndice 2

Diversidade alélica dos sete *loci* microssatélites aplicados em populações de *Astyanax lacustris* na **Escada de Retiro em 2019**

<i>Locus</i>	<i>A</i>	<i>Ar</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>
Asty 04	19	17.11	0.795	0.911	0.128*
Asty 12	08	7.01	0.511	0.513	0.004
Asty 15	23	21.99	0.636	0.925	0.314*
Asty 16	16	16.00	0.485	0.888	0.458*
Asty 23	17	15.33	0.766	0.875	0.125
Asty 26	29	25.44	0.745	0.929	0.187
Asty 27	11	14.70	0.857	0.837	-0.016

A – número de alelos por locus; *Ar* – riqueza alélica; *H_O* – heterozigosidade observada; *H_E* – heterozigosidade esperada; *F_{IS}* – índice de fixação; * *F_{IS}* com valores significativos após a correção de Bonferroni.

Apêndice 3

Diversidade alélica dos sete *loci* microssatélites aplicados em populações de *Astyanax lacustris* do Reservatório de Palmeiras em 2018.

<i>Locus</i>	<i>A</i>	<i>Ar</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>
Asty 04	16	15.71	0.706	0.911	0.228*
Asty 12	06	5.45	0.500	0.447	-0.124
Asty 15	23	23.00	0.839	0.949	0.178
Asty 16	17	15.79	0.525	0.807	0.523*
Asty 23	12	11.56	0.528	0.843	0.308*
Asty 26	24	21.64	0.902	0.942	0.042
Asty 27	14	17.47	0.875	0.892	0.068*

A – número de alelos por locus; *Ar* – riqueza alélica; *H_O* – heterozigosidade observada; *H_E* – heterozigosidade esperada; *F_{IS}* – índice de fixação; * *F_{IS}* com valores significativos após a correção de Bonferroni.

Apêndice 4

Diversidade alélica dos sete *loci* microssatélites aplicados em populações de *Astyanax lacustris* do **Reservatório de Palmeiras em 2019**.

<i>Locus</i>	<i>A</i>	<i>Ar</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>
Asty 04	13	12.85	0.714	0.842	0.153
Asty 12	8	7.80	0.605	0.515	-1.77
Asty 15	38	36.94	0.667	0.962	0.309
Asty 16	15	15.00	0.575	0.878	0.348*
Asty 23	10	9.72	0.667	0.775	0.118
Asty 26	26	25.74	0.805	0.940	0.145*
Asty 27	12	17.00	0.815	0.871	0.187*

A – número de alelos por locus; *Ar* – riqueza alélica; *H_O* – heterozigosidade observada; *H_E* – heterozigosidade esperada; *F_{IS}* – índice de fixação; * *F_{IS}* com valores significativos após a correção de Bonferroni.