UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
DANILO DE ASSUNÇÃO VITORIANO

MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS A CONSERVAÇÃO DO PACU-BRANCO (*Myloplus rubripinnis)* NO RIO TELES PIRES EM ÁREAS IMPACTADAS POR HIDRELÉTRICAS

MOGI DAS CRUZES, SP
2023

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

DANILO DE ASSUNÇÃO VITORIANO

MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS A CONSERVAÇÃO DO PACU-BRANCO (*Myloplus rubripinnis)* NO RIO TELES PIRES EM ÁREAS IMPACTADAS POR HIDRELÉTRICAS

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

Coorientadora: Letícia Rafaela de Morais

MOGI DAS CRUZES, SP

2023

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

V845m

Vitoriano, Danilo de Assunção
Marcadores microssatélites aplicados a conservação do pau-branco (Myloplus rubripinnis) no rio teles pires em áreas impactadas por hidrelétricas / Danilo de Assunção Vitoriano. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
93 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf.
Coorientação: Profa. Dra. Letícia Rafaela de Morais.

1.Variação Genética 2. *Myloplus rubripinnis* 3. Marcadores genéticos 3. Fluxo Gênico I. Hilsdorf, Alexandre Wagner Silva II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 576.58

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia trinta e um de outubro de dois mil e vinte e três, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada: "MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS A CONSERVAÇÃO DO PACU-BRANCO (MYLOPLUS RUBRIPINNIS) NO RIO TELES PIRES EM ÁREAS IMPACTADAS POR HIDRELÉTRICAS", para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Danilo de Assunção Vitoriano**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, e Caio Augusto Perazza, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Welber Senteio Smith, da Universidade Paulista. Sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A sessão pública da defesa da dissertação foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO (aprovado(a) /reprovado(a)) por UNANIMIDADE (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 31 de outubro de 2023.

Comissão Examinadora	Julgamento
Prof. Dr. Welber Senteio Smith	Aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))
Prof. Dr. Caio Augusto Perazza	Aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))
Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf	APROVADO (aprovado(a) / reprovado(a))

Com todo o meu carinho, dedico este trabalho aos meus pais, Hozana e Antonio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nos deu a vida e permite que façamos dela nossas grandes obras;

Aos meus pais, Hozana Assunção e Antônio Vitoriano, por serem sempre o meu ponto de apoio, e que através de suas diferentes linguagens de amor me ajudaram de todas as formas possíveis para que conseguisse me manter na vida acadêmica;

A minha família atual, composta por meu "namorido" Gabriel Nascimento, que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e nos mais felizes, sou grato por esses 6 anos juntos, e por termos construído essa família que tanto amo, composta por dois pais e três gatos: Luke, Noah e Dinah;

A Nayara Teles, uma grande amiga que conheço desde o primeiro dia da graduação e cuja companhia, conversas, conselhos e apoio em momentos cruciais da minha vida me faz adorar nossa amizade;

A Sabrina Costa, uma amiga que tive a oportunidade de conhecer durante minha época de iniciação científica e que, desde então, tem proporcionado muitas conversas engraçadas, que ajudaram a tornar as coisas mais leves. Ela tem me oferecido apoio e companhia em diversos momentos;

Gratidão à equipe do LAGOAA, em particular: Dr. Caio Perazza, um doutor excelente e a pessoa mais incrível em estatística que já conheci, que me deu apoio neste trabalho e por quem desenvolvi um grande carinho. A Claudiane Pinheiro, ou Diane, uma grande parceira, aluna de iniciação científica que tive o imenso prazer de acompanhar. À Gabriela Carvalho, que, mesmo provocando minha ansiedade, me ajudou em alguns momentos e foi com quem tive as melhores conversas durante as idas e vindas para o laboratório. À Ayana Tagashira, uma aluna de iniciação científica que, além de suas várias brincadeiras que me renderam muitas risadas, foi uma pessoa adorável e me ajudou muito. E, claro, à Ma. Nane Teles, uma nordestina maravilhosa, com uma grande fé e uma sensatez cativante; ela merece todas as palmas e flores do mundo.

À Universidade de Mogi das Cruzes – UMC por ceder estrutura necessária para realização dos experimentos e ajuda no financiamento para a participação em congressos;

Ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes pela oportunidade;

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Hilsdorf, um homem de um conhecimento imensurável que acreditou e forneceu esta oportunidade e me acolheu oferecendo todos os meios para a conclusão deste trabalho;

Agradeço especialmente a minha coorientadora Letícia Rafaela de Morais, que além de uma melhor amiga se tornou uma mãe científica para mim, me ajudou e mostrou suporte em todos os momentos que precisei, ela é um sinônimo de mulher guerreira, força e determinação, sou grato por tê-la em minha vida;

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Os peixes são valiosos recursos genéticos que desempenham papéis cruciais na alimentação, pesca, aquicultura, aquarismo e biotecnologia, beneficiando diretamente ou indiretamente os seres humanos. A construção de usinas hidrelétricas é uma resposta à crescente demanda por energia, porém, essa infraestrutura tem impactos significativos no meio ambiente, especialmente nos rios, criando obstáculos para o fluxo gênico entre peixes. O objetivo se baseou no desenvolvimento de um conjunto de marcadores microssatélites específicos para *M. rubripinnis* e, em seguida, aplicar esses marcadores para avaliar a diversidade genética nas populações da espécie afim de compreender os efeitos de uma usina hidrelétrica sobre a dinâmica populacional da espécie. Foram obtidos 10 loci classificados como polimórficos, sendo 4 di, 3 tri- e 3 tetra-nucleotídeos. Em geral os resultados de PIC (Conteúdo Polimórfico Informativo) obtidos variaram de 0,38 a 0,90, com uma média de 0,74, o que indica que o painel proposto é considerado altamente informativo. O painel desenvolvido foi utilizado em 70 indivíduos, sendo 36 coletados a jusante e 34 a montante da UHE Teles Pires. Amostras de DNA foram extraídas e submetidas a reações de amplificação da cadeia de polimerase (PCR) para investigar a presença dos loci STR. As análises moleculares, juntamente com o auxílio de programas estatísticos, apontaram, por meio de indicadores de endogamia, que as populações apresentam um nível médio de parentesco e um alto grau de endogamia. Além disso, evidenciaram diferenciação genética, baixa conectividade e a presença de duas populações geneticamente distintas. Uma dessas populações se encontra a jusante e a outra a montante das antigas corredeiras Sete Quedas no rio Teles Pires. As corredeiras consistiam em uma barreira geográfica semipermeável ao fluxo gênico. O presente estudo aponta a necessidade do monitoramento e manejo da ictiofauna do rio Teles Pires para a conservação de populações determinadas no estudo. Conclui-se que a aplicação de técnicas moleculares na conservação genética de espécies de peixes é uma ferramenta essencial para orientar políticas de manejo e conservação. Os resultados deste trabalho promovem o uso da espécie como modelo em pesquisas futuras sobre a genética da ictiofauna em regiões afetadas por usinas hidrelétricas.

Palavras-chave: diversidade genética; recurso genético; barreira; fluxo gênico.

ABSTRACT

Fish represent valuable genetic resources that play crucial roles in human sustenance, fisheries, aquaculture, aquariums, and biotechnology, directly or indirectly benefiting humans. The construction of hydroelectric power plants is a response to the growing demand for energy; however, this infrastructure has significant environmental impacts, especially on rivers, creating barriers to gene flow among fish populations. The objective was based on developing a set of microsatellite markers specific to *M. rubripinnis* and subsequently using these markers to assess genetic diversity in the species' populations to understand the effects of a hydroelectric power plant on the species' population dynamics. Ten loci were identified as polymorphic, consisting of 4 di-, 3 tri-, and 3 tetra-nucleotides. Overall, the Polymorphic Information Content (PIC) values ranged from 0.38 to 0.90, with an average of 0.74, indicating that the proposed panel is highly informative. The developed panel was applied to 70 individuals, with 36 collected downstream and 34 upstream of the Teles Pires hidroeletric plant. DNA samples were extracted and subjected to polymerase chain reaction (PCR) amplification to investigate the presence of STR loci. Molecular analyses, assisted by statistical programs, revealed, through inbreeding indicators, that populations exhibited a moderate level of relatedness and a high degree of inbreeding. Furthermore, they indicated genetic differentiation, low connectivity, and the presence of two genetically distinct populations, one located downstream and the other upstream of the former Sete Quedas rapids on the Teles Pires River. The rapids represented a semi-permeable geographical barrier to gene flow. This study underscores the need for monitoring and managing the ichthyofauna of the Teles Pires River for the conservation of the populations determined in the study. It is concluded that the application of molecular techniques in the genetic conservation of fish species is an essential tool for guiding management and conservation policies. The results of this work promote the use of the species as a model for future research on the genetics of ichthyofauna in regions affected by hydroelectric power plants.

Keywords: Genetic diversity, genetic resource, barrier, gene flow.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama ilustrativo sobre os serviços ecossistêmicos proporcionado por peixes de água doce 13
Figura 2 - Exemplares de *Myloplus rubripinnis* (MÜLLER; TROSCHEL, 1844)..... 15
Figura 3: Mapa ilustrando a bacia hidrográfica do rio Teles Pires e a localização das Usinas Hidrelétricas (UHEs) ao longo do curso do rio 19
Figura 4: Gel de poliacrilamida 6,5%, com amostras de DNA avaliadas no aparelho DNA Analyzer 4300 e programa SAGA demonstrando a genotipagem das amostras e seus respectivos alelos. 43
Figura 5: Forma detalhada da apresentação dos alelos, onde A: pico representando indivíduos heterozigotos e B: picos representando indivíduos homozigotos..... 43
Figura 6: Resultados de pValor referentes ao EHW dos *loci* polimórficos 47
Figura 7: Mapa descritivo da região de estudo contendo a porção jusante e montante em relação a Usina Hidrelétrica Teles Pires..... 56
Figura 8: Gráfico de calor gerado pelo pacote *popopr* com o percentual de dados perdidos. 59
Figura 9: Análise de *Multi locus Genotyping* (MLG)..... 61
Figura 10: Valor de BIC para escolha do número de *cluster*..... 66
Figura 11: Número de componentes principais a serem retidas..... 67
Figura 12: Análise discriminante por meio de componentes principais (DAPC) para *M. rubripinnis*. Demonstrado em duas formas sendo A. gráfico Compoplot e B. gráfico *Scatterplot* onde ambos contêm informações da população a priori, demonstrando a relação entre ambas populações. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de amplificação utilizadas no termociclador 41
Tabela 2: 10 *loci* polimórficos específicos para espécie *Myloplus rubripinnis* 44
Tabela 3: Análise par a par realizada no programa GENEPOP para verificação dos *loci* que se encontram em desequilíbrio de ligação. 45
Tabela 4: Condições de amplificação utilizadas no termociclador 57
Tabela 5: Média e variância dos estimadores pontuais de parentesco 60
Tabela 6: Correlação entre os Estimadores Pontuais de Parentesco (EPP). 60
Tabela 7: Estatística descritiva (N – número de indivíduos; A – número de alelos; Ar – riqueza alélica; Ho – heterozigosidade observada; He - heterozigosidade esperada; HWE - equilíbrio de Hardy-Weinberg; Fis – coeficiente de endogamia; PA - alelos privativos; PIC - conteúdo de informação polimórfica 62
Tabela 8: Números de alelos privados encontrados em cada *loci* distribuídos nas populações 63
Tabela 9: Aplicação do EPP TrioML nos diferentes locais de amostragem 64
Tabela 10: Aplicação do estimador pontual de parentesco DyadML nos diferentes locais de amostragem para avaliar endogamia 64
Tabela 11: Análise geral sobre o desequilíbrio de ligação (LD) por locus 65
Tabela 12: Número efetivo populacional (Ne) por localidade 65
Tabela 13: Índice de diferenciação Dest (JOST, 2008) 69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
DAPC	*Discriminant analysis of principal components*
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotideos trifosfatados
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
FAO	*Food and Agriculture Organization oh the United Nations*
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kb	Kilobase
LAGOAA	Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
MLG	*Multi locus genotyping*
mM	Milimolar
Ne	Número efetivo
Ng	Nanograma
NGS	*Next Generation sequencing*
PAN	Plano de Ação Nacional
pb	Pares de base
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PIC	Polymorphic Information Content
SSR	*Simple Sequence Repeats* ou microssatélites
STR	*Short Tandem Repeats* ou microssatélites
UHE	Usina Hidrelétrica
UHETP	Usinha Hidrelétrica de Teles Pires
UMC	Universidade de Mogi das Cruzes
µl	Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 12
1.1 A ICTIODIVERSIDADE NA REGIÃO NEOTROPICAL 12
1.2 SERRASALMIDAE 13
1.2.1 Gênero *Myloplus* Gill 14
1.2.2 A espécie *Myloplus rubripinnis* 15
1.3 A BACIA AMAZÔNICA 17
1.3.1 Empreendimentos hidrelétricos no rio Teles Pires 19
1.3.2 Impactos de UHEs sobre a ictiofauna 20
1.4 MARCADORES MOLECULARES APLICADOS A CONSERVAÇÃO 21
1.4.1 Marcadores microssatélites 22
2. JUSTIFICATIVA 24
3. OBJETIVOS 25
3.1 OBJETIVO GERAL 25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25
3.3 APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO 26
REFERÊNCIAS 27
CAPÍTULO 1 34
RESUMO 35
ABSTRACT 36
4. INTRODUÇÃO 37
5. MÉTODO 39
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO E PONTO DE COLETA 39
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA 39
5.3 SEQUENCIAMENTO DE PRÓXIMA GERAÇÃO (NEXT GENERATION SEQUENCING- NGS) 39
5.4 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR E TESTES DE POLIMORFISMO 40
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 41
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 43
6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS *LOCI* MICROSSATÉLITES 43
7. CONCLUSÃO 48
REFERÊNCIAS 49

CAPÍTULO 2 51
RESUMO 52
ABSTRACT 53
8. INTRODUÇÃO 54
9. MÉTODOS 56
9.1 MATERIAL BIOLÓGICO E PONTOS DE COLETA 56
9.2 EXTRAÇÃO DE DNA 56
9.3 REAÇÕES DE PCR 57
9.4 GENOTIPAGEM 58
9.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 58
10. RESULTADOS 59
10.1 ANÁLISE E FILTRAGEM DE BANCO DE DADOS 59
10.2 DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL 61
10.3 DIVERSIDADE GENÉTICA INTERPOPULACIONAL 65
11. DISCUSSÃO 70
11.1 A HIPÓTESE DAS CORREDEIRAS SETE-QUEDAS 74
12. CONSIDERAÇÕES FINAIS 76
REFERENCIAS 77
ANEXOS 82

1. INTRODUÇÃO GERAL

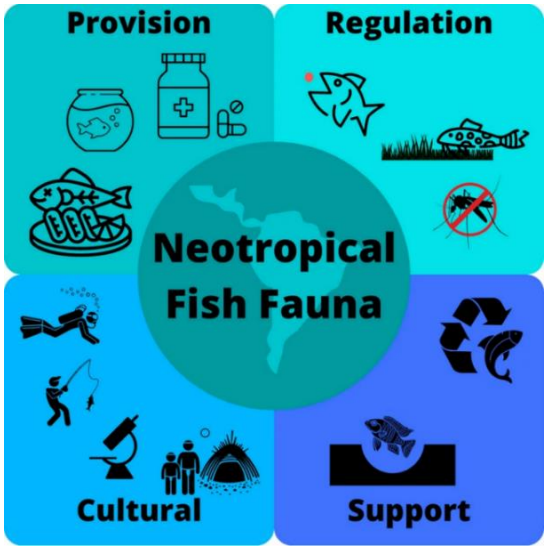
1.1 A ICTIODIVERSIDADE NA REGIÃO NEOTROPICAL

Os ecossistemas de água doce na região Neotropical, que abrange as Américas do Sul e Central, desempenham um papel notável ao abrigar uma parcela significativa da diversidade global de peixes, contribuindo com cerca de 20% a 25% do total (REIS *et al*., 2016). Nessa região, as ordens mais abundantes incluem Characiformes (com 1.289 espécies), Siluriformes (com 1.384 espécies), Cichliformes (com 354 espécies), Cyprinodontiformes (com 245 espécies) e Gymnotiformes (com 135 espécies) (TONELLA *et al*., 2023).

Particularmente, a ictiofauna de peixes de água doce da América do Sul abrange mais de 2.800 espécies taxonomicamente descritas, distribuídas em mais de 60 famílias (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020). A riqueza presente neste ambiente é resultado de fatores biogeográficos e evolutivos, além da crucial relação entre o ser humano e a natureza (MARCENIUK; HILSDORF, 2021).

A diversidade abrangente de espécies de peixes estabelece interações biológicas em todo o ecossistema, desempenhando um papel essencial na dinâmica ambiental e, em alguns casos, servindo como reservatórios de doenças. Esses organismos também desempenham o papel de recursos genéticos aos seres humanos, direta ou indiretamente, devido às múltiplas maneiras pelas quais são utilizados. Desde uma perspectiva cultural até aplicações práticas, como pesca extrativista, aquicultura, aquarismo, gastronomia e na produção de produtos biotecnológicos, os peixes desempenham papéis diversos e significativos. Esses aspectos são destacados na Figura 1 (LEARY *et al*., 2009; PELICICE *et al*., 2023).

Figura 1: Diagrama ilustrativo sobre os serviços ecossistêmicos proporcionado por peixes de água doce



Fonte: PELICICE *et al.*, 2023

O Brasil possui uma vasta ictiodiversidade, resultado da variedade de sistemas hidrográficos que podem ser divididos em sete grandes áreas: Guianas, que compreende os rios Oiapoque e Araguari no Amapá; Nordeste, abrangendo as drenagens entre a foz do rio Amazonas e a foz do rio São Francisco, incluindo o rio Parnaíba; a bacia do rio São Francisco; as bacias do Leste, que englobam sistemas hidrográficos desde a foz do rio São Francisco até o Estado de Santa Catarina, incluindo rios como Paraguaçu, Jequitinhonha, Mucuri, Doce, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape e Cubatão; as bacias costeiras do sul dos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, incluindo o rio Jacuí; a bacia Platina; e a bacia Amazônica (MENEZES, 1996; GOULDING *et al*., 2003; ROSA; LIMA, 2008).

1.2 SERRASALMIDAE

Os serrasalmideos são uma família de peixes endêmica da região neotropical, distribuídos principalmente nas bacias Amazônica, Orinoco e Paraná-Paraguai (REIS, 2003). É a quarta família mais diversa dentro de Characiformes, com 101 espécies válidas, divididas em 16 gêneros, onde mais de 70 espécies possuem ocorrência na bacia Amazônica (DAGOSTA *et al*., 2019; OTA *et al.*, 2020; FRICKE *et al*., 2021). Em relação ao hábito alimentar, os indivíduos dessa família podem ser frugívoros, herbívoros, piscívoros e lepidófagos (consumidores de escamas) (GOULDING, 1980; CORREA *et al*., 2007)

Essa família inclui os peixes populares como pacus, piranhas e o maior characiforme neotropical, o tambaqui, encontrada nos principais sistemas de rios da América do Sul,

abrangendo todos os tipos de ambientes de água doce, com exceção de riachos muito estreitos e áreas profundas dos rios. Os peixes dessa família são facilmente reconhecidos por seu corpo com formato ovoide a discoidal e apresentam escamas modificadas em espinhos na região abdominal, formando uma estrutura que se assemelha a uma serra, daí o nome "Serrasalmidae" (JÉGU, 2003).

Este grupo apresenta grande importância econômica na América do Sul, tanto para a pesca de subsistência de populações ribeirinhas, principalmente na Amazônia, quanto para a pesca comercial e aquicultura (RUFFINO, 2004; FREEMAN *et al*., 2007; OTA *et al*., 2013). Além disso, esses peixes têm valor estético e são muito apreciados no aquarismo, sendo frequentemente criados como animais de estimação em aquários. Ademais, algumas espécies também são comercializadas como *souvenirs* após serem taxidermizadas (FREEMAN *et al*. 2007).

1.2.1 Gênero *Myloplus* Gill, 1896

Os membros deste grupo, encontrados exclusivamente na América do Sul, são popularmente denominados como pacu-peva, e desempenham um relevante papel tanto do ponto de vista ecológico quanto comercial, com destaque especial para a região amazônica (JÉGU 2003; MEUNIER *et al*., 2004). Estes peixes de água doce possuem um corpo ovalado e comprimido lateralmente, sendo agrupados por características distintivas, tais como: a presença de dentes molariformes pré-maxilares dispostos em duas fileiras, separados por um espaço entre os dentes da fila labial que não se conectam na sínfise; uma fossa olfativa estreita; um processo pré-maxilar lateral alongado que se estende além da base do último dente; e espinhos pré-pélvicos bem desenvolvidos (JÉGU, 2003). Uma característica notável é a sua dentição especializada para a quebra de sementes (OTA, 2013).

Segundo ORTÍ *et al*. (2008) e Thompson *et al*. (2014) o grupo *Myloplus* não é considerado monofilético. Ao longo de décadas, o potencial deste gênero permaneceu subestimado, e estamos testemunhando a descoberta de novas espécies nos últimos sete anos, como comprovado pelo registro recente de cinco novas espécies: *M. lucienae* (ANDRADE *et al*., 2016), *M. taphorni* (ANDRADE; LÓPEZ-FERNÁNDEZ; LIVERPOOL, 2019), *M. tumukumak* (ANDRADE; JÉGU; GAMA, 2018), *M. zorroi* (ANDRADE; JÉGU; GIARRIZZO, 2016) e *Myloplus nigrolineatus* (OTA *et al*., 2020).

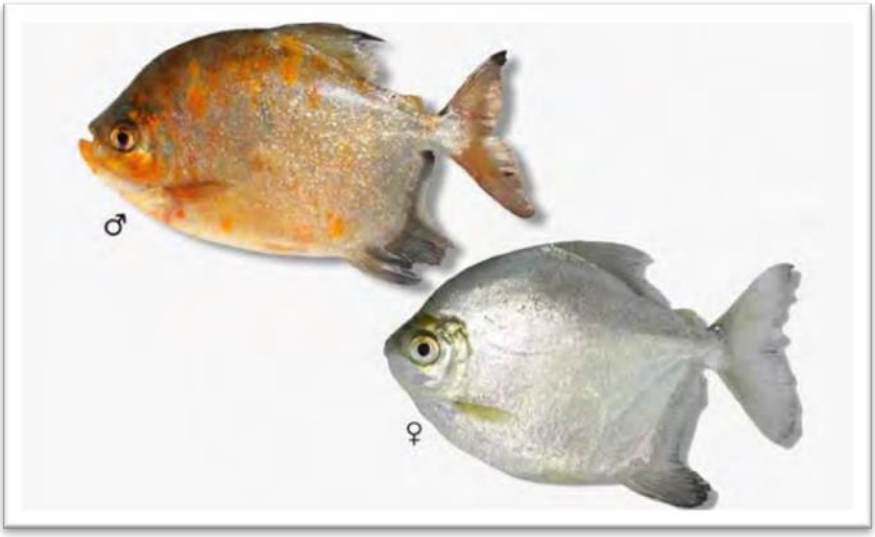
Atualmente, contemplando esse gênero encontramos 15 espécies sendo elas: *Myloplus arnoldi Myloplus asterias, Myloplus levis, Myloplus lobatus, Myloplus lucienae,*

Myloplus nigrolineatus, Myloplus planquettei, Myloplus rhomboidalis, Myloplus schomburgkii, Myloplus ternetzi, Myloplus tietê, Myloplus torquatus, Myloplus tumukumak, Myloplus zorroi e *Myloplus rubripinnis* (Schoch, 2020). Acredita-se que o grupo *Myloplus* esteja na necessidade prioritária de uma revisão taxonômica, dada as técnicas contemporâneas de taxonomia integrativa, juntamente com o uso das recentes tecnologias, como o *DNA barcoding*, valioso na resolução de ambiguidades dentro deste clado (OTA *et al*., 2020).

1.2.2 A espécie *Myloplus rubripinnis*

Myloplus rubripinnis (MÜLLER; TROSCHEL, 1844), conhecido como pacu-branco ou pacu-prata (Figura 2). Esta espécie está distribuída nas bacias do rio Orinoco, no Escudo das Guianas, abrangendo tanto os rios costeiros quanto os rios do médio e baixo Amazonas. Além disso, é encontrada no Escudo Brasileiro, nas bacias dos rios Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins. (JÉGU, 2003; JÉGU *et al*., 2004; VARI *et al*., 2009; OTA *et al*., 2013)

Figura 2 - Exemplares de *Myloplus rubripinnis* (MÜLLER; TROSCHEL, 1844)



Fonte: OHARA *et al*., 2017

Os peixes desta espécie são considerados onívoros e buscam alimento em áreas de pouca correnteza próxima a vegetação marginal. Outra característica é o dimorfismo sexual onde os machos contêm um lóbulo adicional na nadadeira anal, podendo ou não apresentar longos filamentos na nadadeira dorsal e exclusivamente duros ganchos lateralmente curvados na porção distal da nadadeira anal (OTA *et al*., 2013). Já as fêmeas e juvenis apresentam nadadeira anal com aspecto falcado e nunca apresentam filamentos na dorsal ou ganchos na nadadeira anal (OHARA *et al*, 2017).

Uma característica marcante é a coexistência de duas espécies, *M. asterias* (MÜLLER, TROSCHEL, 1844), que guarda semelhança com *M. rubripinnis*, em um mesmo ambiente. Ambas as espécies foram descritas na Guiana, porém podem ser nitidamente diferenciadas com base na contagem de raios na barbatana dorsal. *M. asterias* apresenta de 25 a 28 raios, enquanto *M. rubripinnis* possui 25 ou menos raios na barbatana dorsal. Além disso, a presença de uma fontanela anterior de formato circular em *M. asterias* contrasta com a fontanela de formato oval em *M. rubripinnis* (JÉGU *et al*., 2003).

Ademais, outra espécie que apresenta semelhanças morfológicas com *M. rubripinnis* é a *Myloplus tumukumak.* No entanto, essa espécie se destaca das demais do grupo *Myloplus* devido ao maior tamanho de suas escamas, o que resulta em uma contagem de escamas substancialmente inferior. Esse contraste é marcante em relação às escamas diminutas que são típicas das outras espécies pertencentes ao gênero *Myloplus*. Além disso, é importante ressaltar que a *Myloplus tumukumak* é encontrada em apenas algumas regiões onde *M. rubripinnis* ocorre (ANDRADE, *et al*., 2018; OHARA *et al*., 2017).

A respeito do hábito de vida, os pacus-brancos são reconhecidos como peixes sedentários e por preferirem ambientes de águas rasas ou de profundidade moderada. Em relação a sua reprodução, baseia-se na fertilização externa e na desova total sincronizada com a estação chuvosa, coincidindo com o período de aumento do nível das águas nos rios (FRICKE *et al*., 2018; KOLMANN *et al*., 2020).

As várias espécies deste gênero desempenham um papel fundamental no fornecimento de alimentos para comunidades ribeirinhas e oferecem uma certa relevância no mercado de peixes, atendendo tanto às necessidades de subsistência quanto às demandas da pesca comercial (MAGALHÃES *et al*., 2016). É importante destacar que as pescarias artesanais e de pequena escala desempenham um papel fundamental nesse cenário, sendo responsáveis por mais de metade da produção global de pescado capturado e meios de subsistência a quase 500 milhões de pessoas em todo o mundo (FAO, 2023). Nas pescarias de água doce em regiões tropicais, como na Amazônia brasileira, a pesca artesanal contribui com mais de 50% do total de capturas de peixes. Isso destaca a forte dependência econômica das comunidades locais em relação aos recursos pesqueiros para manter suas fontes de subsistência (BEGOSSI *et al*., 2019).

Na região amazônica, é importante destacar duas espécies de serrasalmídeos, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e os pacus (*Mylossoma* spp., *Myleus* spp. e *Myloplus* spp.), que se destacam como alguns dos peixes mais explorados e comercializados na região (GOULDING, 1980; BATISTA; PETRERE, 2003; MACCORD *et al*., 2007; HALLWASS;

SILVANO, 2016; apud NAGL *et al*., 2021). Outro estudo aponta que *Myloplus* spp. é uma das principais espécies pescadas no Rio Araguari e em seus tributários no estado do Amapá por pescadores artesanais (PRESTES *et al*., 2020).

Além de seu significativo papel na pesca, os pacus-brancos, por causa de sua dieta à base de plantas, desempenham um papel fundamental na dispersão de sementes, um processo conhecido como ictiocoria (SANTOS *et al*., 2016; SILVANO *et al*., 2017). Essa característica atua especialmente na conservação das florestas de várzea, onde a maioria das plantas produz frutos durante as épocas de águas altas, coincidindo com a alimentação desses peixes e por consequência a distribuição de sementes (SOUZA, 2008). Essa combinação contribui significativamente para a manutenção da diversidade e vitalidade dessas florestas, destacando assim os pacus como um grupo essencial na prestação de serviços ecossistêmicos (PELICICE *et al*., 2023).

Devido à sua classificação como uma espécie críptica, as ferramentas moleculares, em particular o *DNA barcoding*, são comumente empregadas para lidar com questões taxonômicas e para a descoberta de novas espécies dentro desse gênero (OTA *et al*., 2020). Em relação a essa espécie em particular, um estudo pioneiro conduzido por Liu e colaboradores (2019) alcançou o mapeamento completo do mitogenoma de *M. rubripinnis*. A partir dessa informação molecular, novos estudos podem ser direcionados para explorar a evolução e ecologia dessa espécie. No entanto, persistisse a ausência de investigações genéticas voltadas para a conservação do *M. rubripinnis*, bem como a falta de compreensão sobre a estruturação genética de suas populações nos rios brasileiros.

1.3 A BACIA AMAZÔNICA

Abrangendo 7.000.000 de km², a Bacia Amazônica é considerada a maior bacia hidrográfica do mundo, atravessando nove países sul-americanos, onde o Brasil detém a maior porção desse território. Dentro dessa vasta extensão, a bacia é responsável por armazenar cerca de 20% da água doce disponível no planeta, além de abrigar uma biodiversidade única e rica. Esse ambiente é conhecido por desempenhar um papel vital na saúde do nosso planeta, exercendo influência tanto na diversidade biológica quanto nas funções cruciais dos ecossistemas (SALATI; VOSE, 1984; TISSEUIL *et al*., 2013; LATRUBESSE *et al*., 2017).

Um dos principais atributos nessa bacia hidrográfica é a sua rica ictiofauna. Nesse ambiente, encontramos cerca de 15% das espécies de peixes de água doce já descritas no

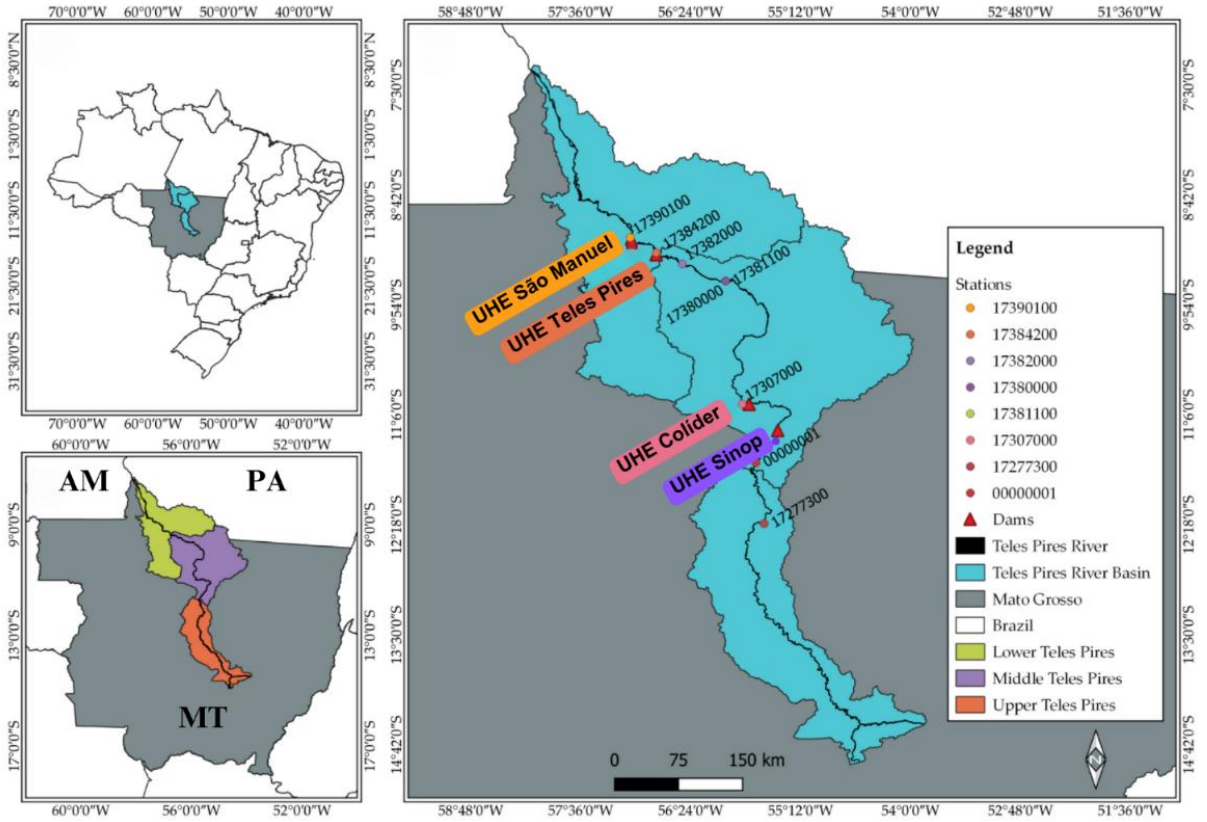
mundo, constituindo uma porção significativa de 85% da diversidade ictiológica presente na América do Sul. Além disso, a Bacia Amazônica ostenta a maior variedade de peixes em todo o planeta, estimando-s+e em torno de 2.400 espécies. Desse número, aproximadamente 45% são exclusivas desse ecossistema, o que enfatiza a necessidade da sua conservação (PAN, 2021; JÉZÉQUEL *et al*., 2020).

Abrangendo os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Rondônia, Roraima, Tocantins, Pará e Maranhão, a Bacia Amazônica ocupa uma vasta parcela, correspondente a 61% do território brasileiro (SUDAM, 2020). Esse conjunto territorial é definido como bioma amazônico (IBGE, 2023). Esta região é renomada pela abundância de recursos hídricos, contemplando os rios Xingu, Tapajós, Negro, Urubu, Amazonas, Madeira e Juruá, que não apenas se conectam a outras vias fluviais nacionais, mas também acolhem uma variada gama de espécies de peixes, tornando esse ambiente o mais rico bioma brasileiro em ictiodiversidade (REIS, 2016).

O bioma Amazônico é responsável por originar centenas de riachos, lagos, rios e cachoeiras (SANTOS; FERREIRA, 1999). Dentre os diversos tributários do rio Amazonas, encontra-se um de seus principais afluentes formado pela conexão dos rios Juruena e Teles Pires.

O Rio Teles Pires, conhecido como Paranatinga ou São Manoel, dispõe de nascentes localizadas entre as cidades de Nova Brasilândia e Primavera do Leste, na Serra Azul e do Finca Faca (14º53’21”S 54º38’08”O) e sua foz entre os estados do Mato Grosso, Amazonas e Pará (7º20’57.77”S e 58º07’54.94”O), abrangendo 32 municípios do Mato Grosso.

Figura 3: Mapa ilustrando a bacia hidrográfica do rio Teles Pires e a localização das Usinas Hidrelétricas (UHEs) ao longo do curso do rio



Fonte: Adaptado de PAULISTA *et al*., 2023

Esse rio dispõe uma extensão aproximada de 1.400km, onde uma parte conta com o bioma Amazônico a jusante da foz do rio Apiacás e sua porção mais alta da drenagem está dentro do bioma de Cerrado com brusca transição entre a floresta Amazônica (ARAUJO *et al*., 2009; ZAPPI *et al*., 2011)

Diversos pontos do rio Teles Pires ainda são inexplorados, e várias espécies novas de peixes foram descritas no mesmo ao longo dos últimos anos (LUCENA, 2003; FERREIRA; NETO-FERREIRA, 2010; NETTO-FERREIRA *et al*., 2014). Um levantamento de ictiofauna realizado por Ohara e colaboradores (2017), estimou-se que aproximadamente 30 espécies poderiam representar novas descobertas científicas.

1.3.1 Empreendimentos hidrelétricos no rio Teles Pires

Através do levantamento realizado pela Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) em 2006, na bacia do Rio Teles Pires, foi identificado um potencial de 3.697 MW

de energia. Tal resultado estimulou a aplicação de empreendimentos hidrelétricos, abrangendo seis usinas hidrelétricas (UHEs Magessi, Sinop, Colíder, Teles Pires, Foz do Apiacás e São Manoel) e sete pequenas centrais hidrelétricas (PCHs Ilha Pequena, Nhandu, Rochedo, Cabeça do Boi, Salto Apiacás, da Fazenda e Salto Paraíso).

A implantação e manutenção de UHEs possuem um alto custo, porém, o que principalmente torna viável a construção deste empreendimento é o valor de seu combustível principal (a água) ser zero. Apesar de ser uma fonte de geração de energia renovável e liberar uma quantidade de gases poluentes muito menor em comparação a outras formas de produção de energia elétrica, as UHEs geram diversos impactos ao meio ambiente, como destruição vegetal natural, o assoreamento do leito dos rios, o desmoronamento de barreiras, a extinção de certas populações de animais, além dos impactos sociais relacionados ao deslocamento das populações que ali viviam (DE QUEIROZ *et al*., 2013).

1.3.2 Impactos de UHEs sobre a ictiofauna

A construção de barragens acarreta um dos impactos mais significativos: a conversão de trechos de rios em ambientes semi-lênticos. Essa transformação tem como consequência a drástica redução das populações de animais e plantas que não são adaptados a esse tipo de sistema. Entretanto, as espécies mais adequadas a ambientes de fluxo d'água reduzido ganham vantagem competitiva e proliferam, gerando uma alteração na diversidade de espécies da região (AGOSTINHO *et al*., 2016).

Os peixes neotropicais evoluíram em um ambiente hidrológico específico, no qual seus comportamentos são baseados aos padrões naturais dos rios, levando a que a maioria deles seja reofílica (nadar contra o fluxo de água) e prefira habitats com grande movimentação de água (PELICICE *et al*., 2017). Diversos fenômenos podem funcionar como “gatilhos” para estimular tanto a desova quanto a migração dos peixes. A reprodução dos peixes está associada ao aumento do nível das águas, ao crescimento da duração da luz do dia (fotoperíodo) e ao aumento da temperatura, o que estimula os peixes a adotarem um comportamento reofílico (MULLER, 1995). A instalação de usinas hidrelétricas muitas vezes reduz ou até aniquila tais gatilhos, dificultando a reprodução de determinadas espécies.

A fragmentação dos habitats naturais, bem como sua perda, são as maiores ameaças para a biodiversidade aquática, e atualmente grande parte dos maiores rios do Brasil estão fragmentados por usinas hidrelétricas (STOFFELS *et al*., 2022). Os peixes migradores

geralmente são os mais prejudicados pelo bloqueio do fluxo longitudinal ao longo dos rios, ocasionando diferenciação genética crescente entre populações localizadas à jusante e à montante das barragens (SILVA *et al*., 2023). Todos os impactos previamente citados são agravados devido à quantidade e proximidade das usinas hidrelétricas construídas. Frequentemente o efeito cumulativo que a construção de barragens exerce sobre a hidrologia e os ecossistemas são ignorados, de modo que o elevado número de hidrelétricas seja construído em uma mesma bacia (CHAUDHARI; POKHREL, 2022)

A utilização de análises genéticas em populações de peixes nas áreas afetadas por hidrelétricas desempenha um papel crucial na compreensão dos efeitos dessas construções nos ecossistemas aquáticos (LIMA *et al*., 2020). Por meio dessas análises, torna-se possível compreender o impacto das barragens na estruturação genética das populações de peixes, detectando alterações na diversidade genética e na conectividade entre diferentes grupos populacionais. Esse conhecimento é vital para orientar estratégias de manejo e conservação, permitindo a identificação de populações em situação de vulnerabilidade e a implementação de medidas para mitigar os efeitos adversos das hidrelétricas (SILVA *et al*., 2023).

1.4 MARCADORES MOLECULARES APLICADOS A CONSERVAÇÃO

Os marcadores moleculares aplicados a estudos de conservação já trouxeram grandes contribuições para diversas espécies, como a estruturação e variações genéticas, auxiliando na obtenção de informações a respeito da diversidade e de relações filogenéticas de diversos organismos (PATWARDHAN *et al*., 2014, GROVER; SHARMA, 2016).

Ao longo dos anos, vários tipos de marcadores foram utilizados nesta área, sendo eles específicos para DNA mitocondrial (mtDNA) ou DNA nuclear (DNAn). Alguns dos mais utilizados foram as análises por eletroforese de proteínas; polimorfismos no tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismos no DNA amplificado aleatoriamente (RAPD), polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), análises de microssatélite, polimorfismos de sítio único (SNP) e marcadores de sequência expressa (EST) (WILLIAMS *et al*., 1990; VOS *et al*., 1995; HILSDORF *et al*., 2006; HILSDORF; HALLERMAN, 2017).

Algumas análises genéticas exigem uma maior quantidade de tecido, armazenamento exclusivo e/ou são amostras retiradas de locais específicos, fazendo que o processo seja custoso e que muitas vezes leve o animal estudado a óbito (OKUMUŞ; ÇIFTCI, 2003). Por questões éticas e cuidados com espécies em risco, a busca por ferramentas moleculares

alternativas, métodos não invasivos e marcadores moleculares altamente polimórficos levou a vários estudos a procura de marcadores mais eficientes (CARVALHO; HAUSER, 1998).

A partir do surgimento da técnica da reação em cadeia da polimerase, ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS; FALOONA, 1987), abriu-se um leque de oportunidades devido a capacidade de multiplicar milhares de vezes uma região específica do material genético que permitiria análises com mais precisão sobre as determinadas variações. Com este propósito, é necessária uma quantidade mínima de tecido, e se tratando de peixes, pode-se utilizar uma pequena parte da nadadeira (que se regenera com o tempo) suficiente para as análises sem a necessidade de sacrificar o animal (CARVALHO; HAUSER, 1998).

Os resultados obtidos a partir da aplicabilidade dessas ferramentas moleculares juntamente com análises estatísticas, possibilitou a compreensão de questões relacionadas a estruturação e origem de diversas espécies de peixes, sendo elas selvagens ou cultivados, trazendo informações a respeito do sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas entre populações, migração, tamanho da população, seleção natural e eventos históricos (PARKER *et al*., 1998; SUNNUCKS, 2000).

1.4.1 Marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites, também chamados de STRs (*short tandem repeats*) ou SSRs (*simple sequence repeats*), são repetições de sequências (*tandem*) formadas por unidades de dois a oito nucleotídeos (*motif*), porém, os que apresentam repetições de 2 a 4 nucletídeos são os preferidos em estudos de genética molecular. Esses marcadores estão espalhados abundantemente pelo genoma dos eucariotos (TAUTZ; RENZ, 1984; TAUTZ, 1989; SELKOE; TONEEM, 2006).

Estes marcadores são codominantes (devido a possibilidade de discriminar os alelos), possuem herança mendeliana e são reconhecidos pelo seu elevado nível de polimorfismo em razão da variação no número de *motifs* entre os indivíduos, causados por erros durante a recombinação, conhecidos como *crossing-over* desigual, ocasionados sobre o pareamento meiótico ou eventos de *slippage* (deslize) da DNA polimerase durante a replicação que ocasiona e duplicação ou eliminação de sequências adjacentes, podendo ser responsável pelas altas taxas de mutação e o número elevado de polimorfismo em microssatélites (TAUTZ, 1989; ZHU *et.al*., 2000; OLIVEIRA *et al*., 2006).

Os STR além de serem regiões curtas do DNA (que nos permite trabalhar com uma maior facilidade com amostras degradadas) também são conhecidos por serem conservados e

amplificados através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), na qual são desenhados iniciadores nas regiões que flanqueiam um STR (LANZA *et al*., 2000).

A região do DNA que mais frequentemente apresenta essas repetições são as regiões não codificantes, ou seja, que não são diretamente influenciadas pela seleção natural. Isso explica a alta variabilidade encontrada nessas áreas. As características dos microssatélites tornam-nos extremamente versáteis, sendo aplicados em uma ampla variedade de áreas, tais como mapeamento genômico, genética forense, análise de parentesco, melhoramento genético, estudos de conservação, investigações filogeográficas e pesquisas em genética populacional. (LIU; CORDES, 2004; HODEL *et al*., 2016).

Atualmente, não existem estudos que tenham utilizado marcadores microssatélites para a espécie *M. rubripinnis*. No entanto, ao explorarmos a mesma família dessa espécie na literatura científica, encontramos exemplos de aplicação de STRs polimórficos para o tambaqui (*Colossoma macropomum*). O tambaqui é uma espécie-chave de grande relevância comercial, o que a torna alvo de pesquisas e interesse científico na produção e conservação, fazendo uso desta ferramenta molecular em prol deste importante recurso genético (SANTOS *et al*., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

A Empresa de Pesquisa Energética - EPE juntamente com o Ministério de Minas e Energia – MME elaboraram dois Planos Nacionais de Energia – PNE planejados para os anos 2030 e 2050 devido à preocupação da evolução no consumo de energia a longo prazo, sugerindo a ampliação de outras fontes de energia renováveis para poupar e diminuir a dependência do uso de fontes hídricas.

O Brasil destaca-se como o país mais biodiverso, especialmente quando se trata da ictiofauna, cuja abundância é mais notável em rios e seus afluentes. No entanto, esses ambientes cruciais têm sido significativamente afetados pelas construções de UHEs, visto que nosso país é um dos maiores usuários de hidroeletricidade no mundo, consequentemente gerando barreiras para diversas espécies de peixes (TUNDISI, 2007; BEN, 2022).

Mesmo com programas de manejo adotados por hidrelétricas, o impacto gerado por este empreendimento é imensurável. Na literatura científica, são documentados casos em que a construção de barragens afeta significativamente as espécies próximas a essas estruturas. Esses impactos incluem alterações na composição das populações de espécies próximas à barragem, a interrupção das rotas migratórias de certos peixes, mudanças nos mecanismos que desencadeiam a desova de peixes neotropicais e a perda das áreas conhecidas como "berçários" para esses peixes (BRITO-SANTOS *et al*., 2021).

Além disso, outro efeito importante é a interrupção do fluxo gênico entre as populações que ficam divididas pelas barragens. No rio Teles Pires, um dos formadores do rio Tapajós, exibe elevada diversidade ictiofaunística e sofre diversos impactos ambientais antrópicos causados ao longo de seu tributário, afetando diversas vidas que dependem dele.

Diante desse contexto, a investigação relacionada à espécie *M. rubripinnis* não só reforça a importância da conservação desse recurso genético, que traz vantagens financeiras e alimentares para as comunidades, como também proporcionará informações valiosas sobre os impactos das Usinas Hidrelétricas (UHEs) nessa espécie. Além disso, os resultados desse estudo fornecerão dados essenciais para a compreensão mais ampla das espécies pertencentes a esse gênero, contribuindo assim para a ampliação do conhecimento científico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

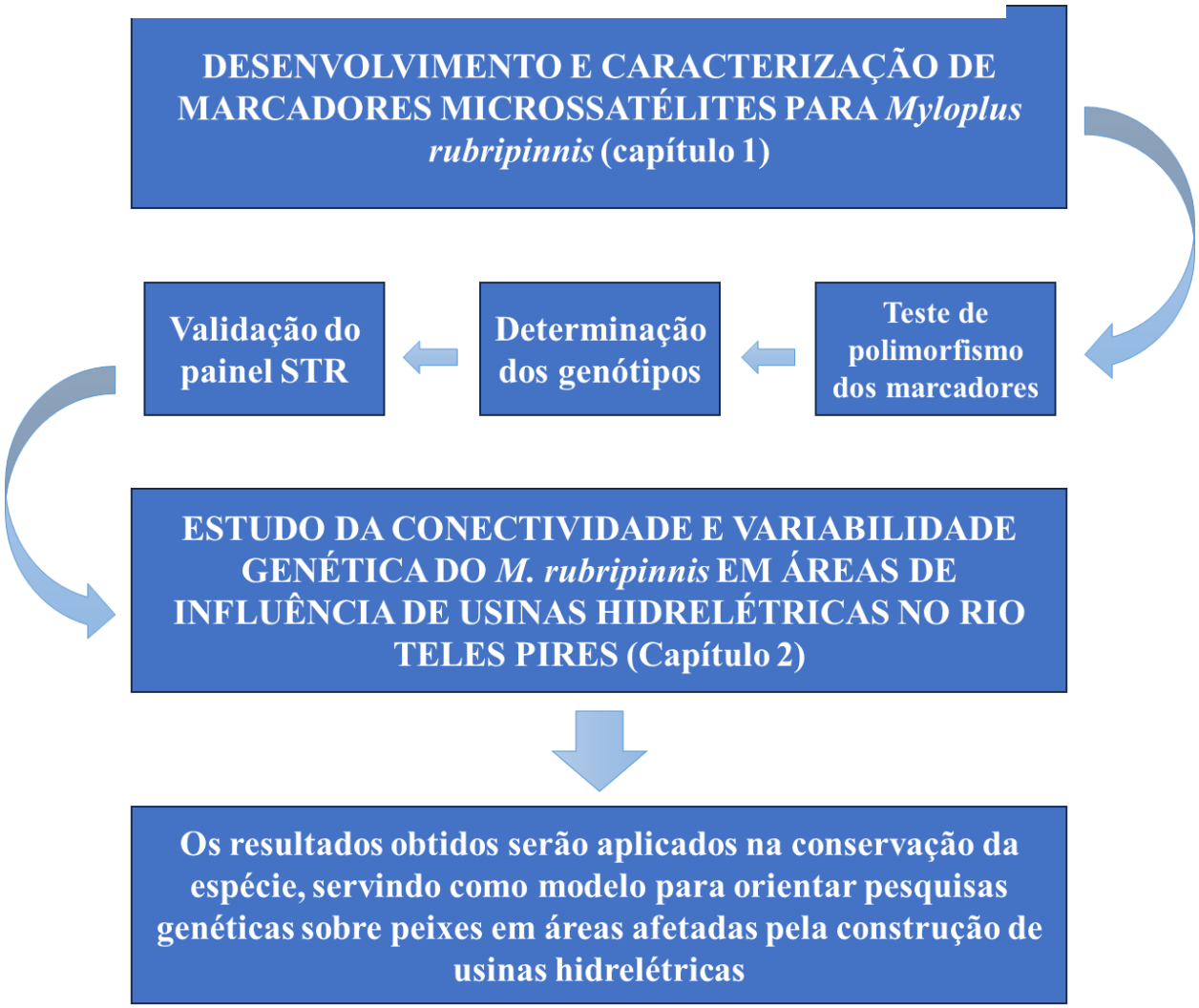
Avaliar a diversidade genética de *M. rubripinnis*, na área de influência direta e indireta da UHE Teles Pires, visando esclarecer o nível de estruturação genética populacional nestas áreas para a espécies-alvo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver painel de *loci* microssatélites espécie-específicos para *M. rubripinnis*
- ✓ Avaliar a diversidade populacional das espécies em estudo por meio dos painéis de *loci* microssatélite desenvolvidos;
- ✓ Verificar o número de populações e o nível de conectividade genética entre elas, além de estimar seu tamanho efetivo populacional.

3.3 APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Figura 4: Fluxograma da apresentação da dissertação



REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SANTOS, N. C. L.; ORTEGA, J. C. G.; PELICICE, F. M. Fish assemblages in Neotropical reservoirs: colonization patterns, impacts and management. **Fisheries Research**, v. 173, n. 1, p. 26-36, 2016.

ANDRADE, M. C.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; LIVERPOOL, E. A. New Myloplus from Essequibo River basin, Guyana, with discussion on the taxonomic status of Myleus pacu (Characiformes: Serrasalmidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 17, 2019.

ANDRADE, M. C.; JÉGU, M.; GAMA, C. S. Uma nova espécie de Myloplus Gill (Characiformes, Serrasalmidae) da Serra do Tumucumaque, Brasil e Guiana Francesa, com comentários sobre M. rubripinnis. **Zootaxa** , v. 1, p. 111-122, 2018.

ANDRADE, M. C.; JÉGU, M.; GIARRIZZO, T. A new large species of Myloplus (Characiformes, Serrasalmidae) from the Rio Madeira basin, Brazil. **ZooKeys**, n. 571, p. 153, 2016.

ANDRADE, M. C.; OTA, R. P.; BASTOS, D. A.; JÉGU, M. A new large *Myloplus* Gill 1896 from rio Negro basin, Brazilian Amazon (Characiformes: Serrasalmidae). **Zootaxa**, v. 4205, n. 6, p. 571-580, 2016.

ARAUJO, R. D. A.; COSTA, R. B. D.; FELFILI, J. M.; GONÇALVEZ, I. K.; SOUSA, R. A. T. D. M.; DORVAL, A. Florística e estrutura de fragmento florestal em área de transição na Amazônia Matogrossense no município de Sinop. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 865-877, 2009.

BATISTA, V. S.; PETRERE J. M. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 53-66, 2003.

BEGOSSI, A.; SALVONCHYK, S.V.; HALLWASS, G.; HANAZAKI, N.; LOPES, P. F. M.; SILVANO, RAM, ...; PITTOCK, J. Consumo de pescado na Amazônia: uma revisão das questões de biodiversidade, energia hidrelétrica e segurança alimentar. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 79, p. 345-357, 2018.

CARVALHO, G. R.; HAUSER, L. Advances in the molecular analysis of fish population structure. **Italian Journal of Zoology**, v. 65, n. S1, p. 21-33, 1998.

CHAUDHARI, S.; POKHREL, Y. Alteration of river flow and flood dynamics by existing and planned hydropower dams in the Amazon River Basin. **Water Resources Research**, v. 58, n. 5, p. e2021WR030555, 2022.

CORREA, S. B.; WINEMILLER, K. O., LOPEZ-FERNANDEZ, H.; GALETTI, M. Evolutionary perspectives on seed consumption and dispersal by fishes. **Bioscience**, v. 57, n. 9, p. 748-756, 2007.

DAGOSTA, F. C.; P; DE PINNA, M. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 2019, n. 431, p. 1-163, 2019.
DE QUEIROZ, R.; KOPPE, E.; GRASSI, P.; TARTAS, B.; LAZZARE, K.; BOZZETTO, C.; DA CUNHA K. P. D. Geração de energia elétrica através da energia hidráulica e seus

impactos ambientais. **Revista eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental**, p. 2774-2784, 2013.

SOUZA, L. L. de Frugivoria e dispersão de sementes por peixes. **Scientific Magazine UAKARI**, v. 1, n. 1, p. 7-18, 2008.

DOS SANTOS, A. L.; DA CUNHA, F. C.; SOARES, M. G. M.; DE SOUZA, L. P.; FLORENTINO, A. C. Conhecimento dos pescadores artesanais sobre a composição da dieta dos pacus (Characiformes: Serrasalmidae) na Floresta Nacional do Amapá, rio Araguari, Amapá, Brasil. **Revista Biotemas**, v. 29, p. 2, 2016.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA-EPE. Balanço energético nacional 2015. **https://ben. epe. gov. br/downloads/Relatório Final_BEN_2015. pdf. Acesso em**, v. 12, n. 06, p. 2016, 2015.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA-EPE. Matriz Energética e Elétrica. **ABC de Energia**. Disponível em: https://www.epe.gov.br/pt/abcdenergia/matriz-energetica-e-eletrica. Acesso em: Jan. 07, 2023. v. 19, n. 01, 2019.

BRITO-SANTOS, J. L.; DIAS-SILVA, K.; BRASIL, L. S.; DA SILVA, J. B.; SANTOS, A. D. M.; DE SOUSA, L. M.; VIEIRA, T. B. Fishway in hydropower dams: a scientometric analysis. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, p. 1-17, 2021.

FERREIRA, K. M.; NETTO–FERREIRA, A. L. *Knodus dorsomaculatus* (Characiformes: Characidae), a new species from Teles Pires River, Tapajós River basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 77, n. 3, p. 468-478, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. International Year of Artisanal Fisheries and Aquaculture closes with many concrete results, 2023 Disponível em: https://www.fao.org/newsroom/detail/IYAFA-2022-closes-with-many-concrete-results-310323/en. Acesso em: 10 nov. 2023.

FREEMAN, B; NICO, L. G.; OSENTOSKI, M.; JELKS, H. L.; COLLINS, T. M. Molecular systematics of Serrasalmidae: deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. **Zootaxa**, v. 1484, n. 1, p. 1–38-1–38, 2007.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. Catalog of fishes: genera, species, references. California Academy of Sciences, San Francisco, CA, USA http://researcharchive.calacademy.org/research/ichtyology/catalog/fishcatmain. asp, 2018.

GOULDING, M. **Os peixes e a floresta**: explorações na história natural amazônica. 1 ed. Berkeley: Universidade da Califórnia Press. 1980.

GOULDING, M.; BARTHEM, R.; FERREIRA, E. J. G. **The Smithsonian atlas of the Amazon**. 2003.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 290-302, 2016.

HALLWASS, G.; SILVANO, R. Patterns of selectiveness in the Amazonian freshwater fisheries: implications for management. **Journal of environmental planning and management**, v. 59, n. 9, p. 1537-1559, 2016.

HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E. M. **Genetic resources of Neotropical fishes**. New York: Springer International Publishing, 2017.

HILSDORF, A. W. S.; RESENDE, E. K. D.; MARQUES, D. K. S. Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas. 2006.

HODEL, R. G.; SEGOVIA-SALCEDO, M. C.; LANDIS, J. B.; CROWL, A. A.; SUN, M.; LIU, X.; SOLTIS, P. S. The report of my death was an exaggeration: a review for researchers using microsatellites in the 21st century. **Applications in plant sciences**, v. 4, n. 6, p. 1600025, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTIC - IBGE. **Censo demográfico**, Disponível em: < https://www. .gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/informacoes-ambientais/15842-biomas.html> . Acesso em: 28 de ago. 2023.

JÉGU, M. Subfamily Serrasalminae. **Reis RE, Kullander SO, Ferraris-Junior CJ. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EdiPUCRS**, p. 182-196, 2003.

JÉGU, M.; HUBERT, N.; BELMONT-JÉGU, E. Réhabilitation de Myloplus asterias (Müller & Troschel, 1844), espèce-type de Myloplus GILL, 1896 et validation du genre *Myloplus* Gill (Characidae: Serrasalminae). **Cybium**, v. 28, n. 2, p. 119-157, 2004.

JÉZÉQUEL, C.; TEDESCO, P. A.; BIGORNE, R.; MALDONADO-OCAMPO, J. A.; ORTEGA, H., HIDALGO, M.; ...; OBERDORFF, T. A database of freshwater fish species of the Amazon Basin. **Scientific data**, v. 7, n. 1, p. 96, 2020.

KOLMANN, M. A.; URBAN, P.; SUMMERS, A. P. Structure and function of the armored keel in piranhas, pacus, and their allies. **The Anatomical Record**, v. 303, n. 1, p. 30-43, 2020.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético, **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

LATRUBESSE, E. M.; ARIMA, E. Y.; DUNNE, T.; PARK, E.; BAKER, V. R.; D'HORTA, F. M.; ...; STEVAUX, J. C. Damming the rivers of the Amazon basin. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 363-369, 2017.

LEARY, D.; VIERROS, M.; HAMON, G.; ARICO, S.; MONAGLE, C. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. **Marine Policy**, v. 33, n. 2, p. 183-194, 2009.

LIMA, M. A.; DORIA, C. R.; CARVALHO, A. R.; ANGELINI, R. Fisheries and trophic structure of a large tropical river under impoundment. **Ecological Indicators**, v. 113, p. 106162, 2020.

LIU, X.; JIANG, J.; LI, C.; BAI, X.; MA, L.; LIU, K. Two complete mitochondrial genomes of *Myloplus rubripinnis* and *Metynnis hypsauchen* (Characiforme: Serrasalmidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 3874-3875, 2019.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, n. 1-4, p. 1-37, 2004.

LUCENA, C. A. S. New characid fish, *Hyphessobrycon scutulatus*, from the rio Teles Pires drainage, upper rio Tapajós system (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 1, p. 93-96, 2003.

MACCORD, P. F.; SILVANO, R. A.; RAMIRES, M. S.; CLAUZET, M.; BEGOSSI, A. Dynamics of artisanal fisheries in two Brazilian Amazonian reserves: implications to co-management. **Hydrobiologia**, v. 583, p. 365-376, 2007.

MAGALHÃES, M. A. Os impactos socioeconômicos causados aos pescadores do médio e baixo madeira a partir da construção da usina hidrelétrica de Santo Antônio. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**, v. 8, n. 2, p. 279-291, 2016.

MARCENIUK, A. P.; HILSDORF, A. W. S. **Peixes: das cabeceiras do rio Tietê e Parque das Neblinas**. São Paulo: Canal 6, 2021.

MENEZES, N. A. Methods for assessing freshwater fish diversity. **Biodiversity in Brazil: a First Approach: Proceedings**, 1996.

MEUNIER, F. J.; FERMON, Y.; JÉGU, M.; KEITH, P. Les piranhas et les kumaru: diversité et biologie. **Piranhas enivrés, des Poissons et des Hommes en Guyane (Meunier FJ, ed.)**, p. 27, 2004.

MULLER, A. C. Hidrelétricas, meio ambiente e desenvolvimento. Rio de Janeiro: **MAKRON Books**, 1995.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 335-350, 1987

NAGL, P.; HALLWASS, G.; TOMAZONI-SILVA, L. H.; NITSCHKE, P. P.; ROWEDDER, A. R.; ROMERO-MARTINEZ, A. T.; SILVANO, R. A. Protected areas and frugivorous fish in tropical rivers: Small-scale fisheries, conservation, and ecosystem services. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 31, n. 10, p. 2752-2771, 2021.

NETTO-FERREIRA, A. L.; BIRINDELLI, J. L. O.; SOUSA, L. M.; MENEZES, N. A. A new species of Rhinopetitia Géry 1964 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Rio Teles Pires, Rio Tapajós basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 84, n. 5, p. 1539-1550, 2014.

OHARA, W. M.; LIMA, F. C. T.; SALVADOR, G. N.; ANDRADE, M. C. **Peixes do rio Teles Pires:** diversidade e guia de identificação. Gráfica Amazonas e Editora Ltda–EPP, Aparecida de Goiânia, 2017.

OKUMUŞ, I.; ÇIFTCI, Y. Fish population genetics and molecular markers: II-molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 3, n. 1, 2003.

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

ORTÍ, G.; SIVASUNDAR, A.; DIETZ, K.; JÉGU, M. Phylogeny of the Serrasalmidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 343-351, 2008.

OTA, R. P.; MACHADO, V. N.; ANDRADE, M. C.; COLLINS, R. A.; FARIAS, I. P.; HRBEK, T. Integrative taxonomy reveals a new species of pacu (Characiformes: Serrasalmidae: Myloplus) from the Brazilian Amazon. **Neotropical Ichthyology**, v. 18, 2020.

OTA, R. P.; RÖPKE, C. P.; ZUANON, J. A. S.; JÉGU, M. Serrasalmidae. **Peixes do Rio Madeira-Y-Cuyari Pirá-Ketá,** pgs. 14-47, 2013.

PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M. D.; BOOTON, G. C.; FUERST, P. A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 361-382, 1998.

PATWARDHAN, A.; RAY, S.; ROY, A. Molecular markers in phylogenetic studies-a review. **Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology**, 2(2), p.131, 2014.

PAULISTA, R. S. D.; DE ALMEIDA, F. T.; DE SOUZA, A. P.; HOSHIDE, A. K.; DE ABREU, D. C.; DA SILVA ARAUJO, J. W.; MARTIM, C. C. Estimating suspended sediment concentration using remote sensing for the Teles Pires River, Brazil. **Sustainability**, v. 15, n. 9, p. 7049, 2023.

PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, A. A.; AZEVEDO-SANTOS, V. M.; BESSA, E., CASATTI, L.; GARRONE-NETO, D.; ZUANON, J. Ecosystem services generated by Neotropical freshwater fishes. **Hydrobiologia**, v. 850, n. 12-13, p. 2903-2926, 2023.

PELICICE, F. M.; AZEVEDO-SANTOS, V. M.; VITULE, J. R.; ORSI, M. L.; LIMA JUNIOR, D. P.; MAGALHÃES, A. L.; AGOSTINHO, A. A. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. **Fish and fisheries**, v. 18, n. 6, p. 1119-1133, 2017.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Planos de ação nacional para a conservação de espécies ameaçadas de extinção**. Disponível em: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan. Acesso em: 10 abr, 2023.

PRESTES, L.; DA CUNHA, F. C.; SOARES, M. G. M.; OLIVEIRA, M. S. B.; OLIVEIRA, N. I.; FLORENTINO, A. C. Stock Assessment: Sustainable management in high and medium Araguari River, Amapá, Brazil. **Ciência e Natura**, v. 42, p. e71-e71, 2020.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

REIS, R. E. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, 2003.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**, v. 2, p. 9-19, 2008.

RUFFINO, M. L. A. Pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira. **Manaus: Ibama/ProVárzea**, v. 256, 2004.

SALATI, E.; VOSE, P. B. Amazon basin: a system in equilibrium. **Science**, v. 225, n. 4658, p. 129-138, 1984.

SANTOS, G. M. D.; FERREIRA, E. J. G. Peixes da bacia amazônica**. Estudos ecológicos de comunidaddes de peixes tropicais**, pgs. 345-373, 1999.

SANTOS, M. D. C. F.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalmidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 3, p. 874-876, 2009.

SCHOCH, C.L.; CIUFO, S.; DOMRACHEV, M.; HOTTON, C. L.; KANNAN, S.; KHOVANSKAYA, R.; LEIPE, D.; MCVEIGH, R.; O'NEILL, K.; ROBBERTSE, B.; SHARMA, S.; SOUSSOV, V.; SULLIVAN, J. P.; SUN, L.; TURNER, S.; KARSCH-MIZRACHI, I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. v. 2020, p. 62, 2020.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology letters**, v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006.

SILVA, A. L. B.; GALVÃO, G. A.; ROCHA, A. A. F. D.; GUTIERRE, S. M. M.; SANTOS, G. R. D.; COSTA, B. D. F. D.; NICOLA, P. A. Ichthyofauna on the move: fish colonization and spread through the São Francisco Interbasin Water Transfer Project. **Neotropical Ichthyology**, v. 21, p. e220016, 2023.

SILVANO, R. A.; HALLWASS, G.; JURAS, A. A.; LOPES, P. F. Assessment of efficiency and impacts of gillnets on fish conservation in a tropical freshwater fishery. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 27, n. 2, p. 521-533, 2017.

STOFFELS, R. J.; HUMPHRIES, P.; BOND, N. R.; PRICE, A. E. Fragmentation of lateral connectivity and fish population dynamics in large rivers. **Fish and Fisheries**, v. 23, n. 3, p. 680-696, 2022.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in ecology & evolution**, v. 15, n. 5, p. 199-203, 2000.

SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DA AMAZÔNIA - SUDAM. **Plano Regional de Desenvolvimento da Amazônia**. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL, 2021.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic acids research**, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.

THOMPSON, A. W.; BETANCUR-R, R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; ORTÍ, G. A time-calibrated, multi-locus phylogeny of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalmidae) and a comparison of species tree methods. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 81, p. 242-257, 2014.

TISSEUIL, C., CORNU, J.F., BEAUCHARD, O., BROSSE, S., DARWALL, W., HOLLAND, R., HUGUENY, B., TEDESCO, P.A., OBERDORFF, T., 2013. Global diversity patterns and cross-taxa convergence in freshwater systems. **Journal of Animal Ecology,** v. 82, n. 2, p.365-376. 2013.

TONELLA, L. H.; RUARO, R.; DAGA, V. S.; GARCIA, D. A. Z.; VITORINO, O. B.; LOBATO-DE MAGALHÃES, T.; CARMASSI, G. R. NEOTROPICAL FRESHWATER FISHES: **A dataset of occurrence and abundance of freshwater fishes in the Neotropics**. 2023.

TUNDISI, J. G. Exploração do potencial hidrelétrico da Amazônia. **Estudos Avançados**, v. 21, p. 109-117, 2007.

VARI, R. P.; FERRARIS JR, C. J.; RADOSAVLJEVIC, A.; FUNK, V. A. Checklist of the freshwater fishes of the Guiana Shield. **Bulletin of the Biological Society of Washington**, v. 17, n. 1, 2009.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acid Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

ZAPPI, D. C.; SASAKI, D.; MILLIKEN, W.; IVA, J.; HENICKA, G. S.; BIGGS, N.; FRISBY, S. Vascular plants from the Parque Estadual Cristalino, northern Mato Grosso, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 41, p. 29-38, 2011.

ZHU, Y.; STRASSMANN, J. E.; QUELLER, D. C. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. **Genetics Research**, v. 76, n. 3, p. 227-236, 2000.

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Myloplus rubripinnis*

Danilo de Assunção Vitoriano[1], Letícia Rafaela de Morais[1], Claudiane Aparecida Alves Pinheiro[1], Raquel Fernanda Raposo Palazzo[1], Caio Augusto Perazza[1,2], Alexandre Wagner Silva Hilsdorf[1]

[1]Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Caixa Postal 411, 08701-970, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

[2]Departamento de Oceanografia Biológica, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Praça do Oceanográfico, 191, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente: Alexandre Wagner Silva Hilsdorf
Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Caixa Postal 411, 08701-970, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.
wagner@umc.br, +55 11 4798-7210

RESUMO

A construção de Usinas Hidrelétricas (UHEs) gera impactos ambientais prejudiciais à biodiversidade local, especialmente às populações de peixes, tornando as UHEs uma das principais ameaças aos ecossistemas de água doce. O uso de técnicas moleculares é valioso para compreender os efeitos nas populações de peixes. Os microssatélites são marcadores moleculares que se tornaram uma das ferramentas mais populares em estudos genéticos devido ao seu alto polimorfismo e sua relativa facilidade de obtenção, sendo possível analisar a variabilidade genética das populações amostradas. O presente trabalho contou com a amostra de 30 indivíduos coletados à jusante e à montante da barragem da UHE Teles Pires, ao longo do rio Teles Pires/MT, sendo submetidas ao método de extração salina de DNA, o qual foi quantificado e avaliado quanto a sua pureza. Foram testados inicialmente 54 locus di, tri e tetranucleotídeos para seleção de 10 locus polimórficos, utilizando todas as amostras para serem amplificadas e genotipadas com o equipamento Li-Cor DNA Analyzer 4300 (IR2, Lincoln, NE, USA) para posterior análise estatística. Todos os microssatélites apresentados foram testados a fim de identificar os mais polimórficos, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Até o momento foram encontrados 10 locus classificados como polimórficos, sendo 4 di, 3 tri- e 3 tetra-nucleotídeos. Em geral os resultados de PIC (Conteúdo Polimórfico Informativo) obtidos variaram de 0,38 a 0,90, com uma média de 0,74, o que indica que o painel proposto é considerado altamente informativo. No presente trabalho obtivemos um painel de 10 locus polimórficos para a espécie *M. rubripinnis*. Com a aplicabilidade desse painel em trabalhos futuros será possível entender a conectividade das populações amostradas e compreender o fluxo genético da espécie, e se necessário, propor programas de conservação para este importante recurso genético.

Palavra-chave: conteúdo polimórfico informativo; sequências curtas repetidas; genética de populações.

ABSTRACT

The construction of Hydroelectric Power Plants (HPPs) generates harmful environmental impacts on local biodiversity, especially fish populations, making HPPs one of the main threats to freshwater ecosystems. The use of molecular techniques is valuable for understanding the effects on fish populations. Microsatellites are molecular markers that have become one of the most popular tools in genetic studies due to their high polymorphism and relative ease of obtaining, making it possible to analyze the genetic variability of the populations sampled. This study included a sample of 30 individuals collected downstream and upstream of the Teles Pires HPP dam, along the Teles Pires River/MT. They were subjected to the saline DNA extraction method, which was quantified and assessed for purity. Initially, 54 di-, tri- and tetranucleotide loci were tested to select 10 polymorphic loci, using all the samples to be amplified and genotyped using the Li-Cor DNA Analyzer 4300 (IR2, Lincoln, NE, USA) for subsequent statistical analysis. All the microsatellites presented were tested in order to identify the most polymorphic ones, using the polymerase chain reaction (PCR) technique. So far, 10 loci have been found to be polymorphic, 4 of which are di-, 3 tri- and 3 tetra-nucleotides. In general, the PIC (Polymorphic Information Content) results obtained ranged from 0.38 to 0.90, with an average of 0.74, which indicates that the proposed panel is considered highly informative. In this study, we obtained a panel of 10 polymorphic loci for the species *M. rubripinnis*. With the applicability of this panel in future work, it will be possible to understand the connectivity of the populations sampled and understand the genetic flow of the species, and if necessary, propose conservation programs for this important genetic resource.

Keywords: polymorphic information content; short repeated sequences; population genetics.

4. INTRODUÇÃO

A instalação de Usinas Hidrelétricas (UHEs) acarreta uma série de impactos ambientais significativos. Esses empreendimentos afetam sobretudo a biodiversidade local, resultando em diversos danos para as espécies que habitam a região. Além disso, as UHEs também têm um impacto marcante no fluxo de água dos rios, provocando mudanças físicas que causam alterações profundas na tipologia, quantidade e qualidade dos habitats aquáticos disponíveis (FAUCHEUX *et al.*, 2023), bem como na diversidade e composição das populações de peixes presentes (WINSTON *et al*., 1991).

Esses impactos sobre as populações de peixes tornam as usinas hidrelétricas uma das principais ameaças à biodiversidade dos ecossistemas de água doce (VÖRÖSMARTY *et al*., 2010). Quando barragens e os reservatórios relacionados são erguidos em seções do mesmo rio, é possível intensificar ainda mais os impactos sobre a biota aquática e a dinâmica dos ecossistemas (BEM *et al.*, 2021). Portanto, a construção de barragens em rios representa uma preocupação significativa para a conservação dos ecossistemas aquáticos e suas espécies.

Portanto, para compreender melhor os efeitos dessas alterações nos ecossistemas aquáticos e nas populações de peixes, o uso de técnicas moleculares tem se mostrado valioso. A avaliação da diversidade genética dos organismos aquáticos por meio dessas técnicas moleculares, incluindo a análise de marcadores microssatélites, tem sido documentada em estudos anteriores (MEMIS, 2006; HILSDORF *et al*., 2006; HILSDORF; HALLERMAN, 2017). Essas abordagens fornecem dados importantes que podem auxiliar na conservação e na gestão adequada dos ecossistemas aquáticos frente às mudanças causadas pelas barragens.

Os Microssatélites (STR) são sequências curtas de 1-6 nucleotídeos repetidos um após o outro (tandem), destacam-se por serem altamente polimórfico e com distribuição abundante no genoma, alto conteúdo de informação polimórfica, herança codominante e amplificados via Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) (SCHLÖTTERER, 2000; FALEIRO, 2007; SELKOE; TOONEN, 2006).

Uma característica notável dos marcadores STR é conseguir trabalhar com DNA degradado ou de baixa concentração. Isso se deve ao fato de que esses marcadores estão localizados em segmentos menores ao longo do material genético (LANZA *et al*., 2000).

Além disso, sua utilidade é ressaltada pelo emprego de amostragem não invasiva, especialmente relevante no estudo de peixes. Nesse contexto, a coleta de pequenos fragmentos de nadadeira é suficiente para análises, evitando a necessidade de sacrificar os

animais. Esse enfoque não apenas preserva a vida dos organismos em questão, mas também desempenha um papel significativo na promoção da conservação (CARVALHO; HAUSER, 1998).

Em decorrência dos eventos causados pelas construções de empreendimentos hidrelétricos, torna-se necessário a elaboração de ferramentas capazes de aferir a estruturação genética das espécies afetadas em áreas de influência de usinas hidrelétricas. O painel de marcadores STR permitirá uma melhor compreensão sobre os padrões de fluxo gênico, número e níveis de endogamia das populações, dentre outros parâmetros genéticos importantes.

5. MÉTODO

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO E PONTO DE COLETA

Fragmentos de nadadeiras caudais de indivíduos *M. rubripinnis* foram coletados ao longo do período entre 01/2020 a 11/2020 pelas empresas Ichthyology e Bios, posteriormente enviadas ao Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA) da UMC - Campus Mogi das Cruzes. As coletas foram realizadas em pontos amostrais localizados à jusante e à montante da barragem da UHE Teles Pires, ao longo do rio Teles Pires/MT. O material biológico, assim que coletado, foi armazenado em microtubos contendo etanol 95% e mantidos em temperatura ambiente até o envio ao laboratório de pesquisa.

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído a partir da nadadeira caudal dos indivíduos, seguindo o protocolo de extração salina (ALJANABI; MARTINEZ, 1997) e posteriormente, a verificação da qualidade e da integridade do material genético foi feita por meio de gel de agarose a 1,0 % e em seguida, corrido em eletroforese horizontal, utilizando marcadores de peso molecular (Lambda DNA/HindIIIFermentas, O'Gene Ruler 1Kb DNA Ladder Plus-Fermentas e Low DNA Mass LadderInvitrogen). Fatores como pureza (260nm/280nm) e concentração (em ng/μL) do material extraído, foram verificadas por densidade óptica através de espectrofotometria NanoDrop™ One Microvolume (Thermo Scientific™)

5.3 SEQUENCIAMENTO DE PRÓXIMA GERAÇÃO (NEXT GENERATION SEQUENCING- NGS)

O DNA de apenas um indivíduo foi submetido ao sequenciamento de Next-Generation Sequencing (NGS) pela plataforma Illumina HiSeq 2500 (Illumina Inc., San Diego, CA), na modalidade WGS (Whole Genome Sequencing), sequenciamento paired-end. Feito isso, as sequências foram analisadas pelo programa Real Time Analysis (fornecido pela Illumina), responsável pela conversão das sequências para o formato FastQ v. 0.11.4, com cada base acompanhada de um escore de qualidade Phred (EWING; GRENN, 1998).

A filtragem das bases com qualidade baixa e das sequências de adaptadores foi feita com o programa BBDuk, do pacote BBTools versão 37.02. Leituras menores que 75 pares de bases foram removidas. Realizou-se a montagem de um rascunho do genoma usando o software MEGAHIT 1.1.1 (LI *et al*., 2015), com tamanhos de kmer de 21 a 71. A busca por sequências que continham repetições microssatélites foi feita com auxílio do software BatchPrimer3, selecionando-se apenas microssatélites di, tri e tetranucleotídeos. Os microssatélites foram escolhidos aleatoriamente pelo genoma para que se alcançasse o máximo de representatividade e evitar vieses nas análises.

Os iniciadores que flanqueiam as regiões STR foram selecionado de acordo com os seguintes critérios: (i) Localização dos primers: os primers *forward* e *reverse* não estarem localizados nas extremidades do contig; (ii) Temperatura de anelamento dos *primers*: *primers* com temperatura de anelamento entre 50 e 65°C, com diferença máxima de 5°C nas respectivas temperaturas de anelamento dos *primers forward* e *reverse*; (iii) Conteúdo GC dos *primers*: seleção de primers com conteúdo de GC (guanina e citosina) entre 40 e 70%; (iv) Tamanho dos *primers*: *primers* com tamanho entre 18 a 21 pb (pares de bases); (v) Tamanho dos *amplicons*: seleção de *amplicons* com tamanho entre 120 e 220 pb; (vi) Estruturas secundárias dos *primers*: seleção de *primers* sem formação de estruturas secundárias estáveis (*Hairpins*, dímeros e heterodímeros), além de limitar o número máximo de nucleotídeos iguais lado a lado a 4 (ex.: ACTTTTGT); (vii) Estabilidade físico-química dos *primers*: seleção de *primers* com grampo GC de no mínimo 3 nucleotídeos nas extremidades 3' do *forward* e *reverse*; (viii) *Motif*: seleção apenas de marcadores com repetições perfeitas.

As análises físico-químicas supracitadas foram realizadas por meio da ferramenta *OligoAnalizer*® (*Integrated DNA Technologies*),a qual permite analisar a estabilidade termodinâmica dos *primers* desenvolvidos. Um número mínimo inicial de 34 iniciadores foi selecionado para as análises experimentais, de modo que, caso o sucesso nas amplificações de tais marcadores fosse baixo, novos primers foram selecionados e sintetizados.

5.4 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR E TESTES DE POLIMORFISMO

Todos os *primers forwards* selecionados na etapa anterior foram sintetizados adicionando-se a sequência 5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3' na extremidade 5' para um futuro anelamento da cauda M13 (SCHUELKE, 2000). Os SSRs desenvolvidos foram submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando material genético de cinco indivíduos aleatórios em cinco temperaturas de anelamento diferentes (54, 56, 58 e 60ºC) a fim de

identificar a ideal para os experimentos. Essas amostras foram avaliadas para a validação do painel de marcadores microssatélites específicos para a espécie, 10 *locus* apresentaram evidências de polimorfismo. Inicialmente este teste foi realizado amplificando os *loci* por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para um volume final de 25µL contendo: 30ng/µL de DNA, 2,0 µL de solução tampão com Cloreto de potássio KCl, 1,8 µL de dNTP à 10mM, 10mM de cada iniciador, em relação às concentrações de Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) alguns testes foram feitos variando entre 2,0 e 2,5 mM.

Algumas condições de amplificação padrão foram utilizadas no termociclador (Tabela 1), porém a temperatura de anelamento variou de 54ºC a 58ºC.

Tabela 1: Condições de amplificação utilizadas no termociclador

Ciclos	Etapas	Temperatura (ºC)	Tempo (seg)
1x	Desnaturação inicial	95	180
35x	Desnaturação	94	30
	Anelamento	De 54 a 60	60
	Extensão	72	60
1x	Extensão final	72	420

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, e em seguida visualizados para a verificação da qualidade das bandas no fotodocumentador ImageQuant TM 300 Imager (GE HealthcareLife), utilizando o marcador de 100pb DNA Ladder-Sinapse).

Após a padronização das condições de amplificação dos *loci* polimórficos, 30 indíviduos foram utilizados para a avaliação da estrutura das populações. Os amplicons resultantes foram corridos em um gel de poliacrilamida 6,5% em um sequenciador de DNA semiautomático (DNA Analyzer 4300; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). Os alelos foram identificados usando um marcador de 50-350 bp (LI-COR Biosciences), e os genótipos foram analisados usando o software SAGA v.3.3 (LI-COR Biosciences).

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os *loci* microssatélites selecionados foram testados em relação à presença de alelos nulos em quatro softwares diferentes, sendo eles o pacote MICRO-CHECKER 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al*., 2004), pacote Cervus v.3.0.7 (KALINOWSKI *et al*., 2007), ML-NULLFREQ (KALINOWSKI; TAPER, 2006) e FreeNa (CHAPUIS; ESTOUP, 2007). O

equilíbrio de Hardy-Weinberg com o pacote HW-Quickcheck (KALINOWSKI *et al*., 2006) e a evidência de desequilíbrio de ligação entre os *locus* (LD) com a utilização do pacote GENEPOP ON THE WEB 4.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). A diversidade genética foi estimada pelo número de alelo por *locus*, riqueza alélica, coeficiente de endogamia, heterozigosidade observada e esperada e número de alelos privativos, com os pacotes diveRsity (KEENAN *et al*., 2013) e DEMEtics do programa R (R Development Core Team, 2015) e o valor do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC - Polymorphic Information Content) de cada *locus* foi avaliado com o uso do pacote Cervus v.3.0.7 (KALINOWSKI *et al*., 2007), escolhendo apenas os *loci* com PIC acima de 0,25.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS *LOCI* MICROSSATÉLITES

A primeira parte deste trabalho apresenta marcadores microssatélites espécie-específicos padronizados para a espécie *M. rubripinnis*. Esta ferramenta desenvolvida será necessária em estudos populacionais, permitindo a compreensão da espécie.

Por meio da genotipagem dos *loci* polimórficos (figuras 4 e 5) em uma seleção de 30 peixes, observou-se que, na maioria dos loci analisados, foram encontrados alelos em todas as amostras. A exceção ocorreu nos *loci* MYR04 e MYR05, que estavam presentes em 27 e 29 indivíduos, respectivamente. Esse resultado indica que os *loci* incluídos neste painel

Figura 6: Gel de poliacrilamida 6,5%, com amostras de DNA avaliadas no aparelho DNA Analyzer 4300 e programa SAGA demonstrando a genotipagem das amostras e seus respectivos alelos.

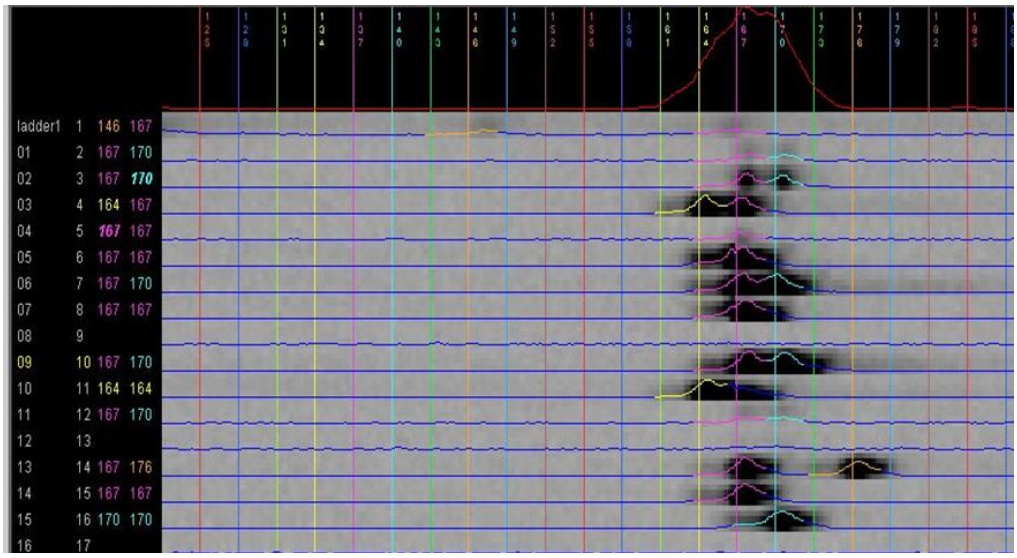
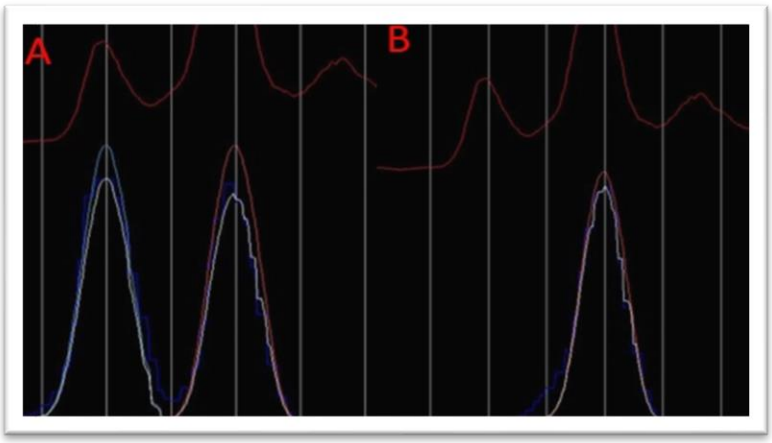


Figura 5: Forma detalhada da apresentação dos alelos, onde A: pico representando indivíduos heterozigotos e B: picos representando indivíduos homozigotos



demonstram uma alta frequência de ocorrência.

O estudo gerou 54 marcadores sintetizados e testados para a espécie *Myloplus rubripinnis*, porém, 44 destes não apresentaram sucesso na amplificação via PCR ou apontaram ausência de polimorfismo. Dentre os marcadores restantes, 10 são polimórficos, sendo 4 marcadores di., 3 tri. e 3 tetranucleotídeos apresentados na tabela 2.

Tabela 2: 10 *loci* polimórficos específicos para espécie *Myloplus rubripinnis*

Locus	Sequência iniciadores (5'-3')	TA (°C)	*Motif*	N	A	Aa	Ar	Ho	He	PIC
MYR04	F: *CTGAAGGAACCGAAAGAGT R: CCCAAACACACACATCTCT	56	TG	29	10	132-204	9,85	0.414	0.835	0.798
MYR05	F: *AGACAGGGAGGGATGAAG R: GCTGCTCTCACACAGTCAA	58	GA	27	9	142-190	9,00	0.444	0.794	0.759
MYR07	F: *GGATTGGGGTACAAAGAGA R: AACAATGACCGACTTCACA	56	AC	30	11	147-187	10,98	0.433	0.901	0.875
MYR10	F: *ATACCAGCATTAGCGTGTG R: GTGAGTGAAGGGAGGTGAC	58	GT	30	7	135-195	6,99	0.367	0.795	0.751
MYR13	F: *GCCCAGGTCTAGTCACAAC R:TTCTCTGGTGTGATGAAGC	58	TAT	30	17	153-237	16,56	0.567	0.923	0.901
MYR16	F:*ACCAGCAACTTCCTACGAT R:GGATTCAGTGAAGGGCTTA	56	ATA	30	12	160-184	11,65	0.333	0.808	0.772
MYR19	F: *AGGTTGGACTGACAAATGTT R:AGGTATGGGAGCAGCTTTA	58	AAAG	30	4	141-189	3,89	0.167	0.431	0.382
MYR20	F: *CCATCAGCCAGAAGAATG R: GCACAGTTACAAATAAGCCA	60	ATA	30	7	219-255	6,79	0.367	0.713	0.657
MYR35	F: *CCAACAGCAACAAGATCAC R:GACAGACAGAGAAAGACAGC	54	GTCT	30	11	132-196	10,85	0.233	0.822	0.790
MYR36	F: *GACGCACACTCACGATTAC R: TCATGTGGATCTGAACACC	58	ATGA	30	6	140-196	5,99	0.467	0.756	0.707

*TGTAAAACGACGGCCAGT (sequência da cauda m13 inserida na região 5', Ta(°C): temperatura de anelamento; N: número de amostras; A: número de alelos; Aa: tamanho do amplicon; Ar: riqueza alélica; Ho: Heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; PIC: conteúdo de informação polimórfica

As informações sobre o *motif* de cada *loci*, número de alelos, estimativas de diversidade (Ho e He), PIC, riqueza alélica e probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) obtidos podem ser visualizados na tabela 2. Para tais marcadores, o número de alelos variou de 4 (MYR19) a 17 (MYR13), de modo que o *locus* MYR13 apresentou maior valor de riqueza alélica (16,56) e o *locus* MYR19 apresentou o menor (3,89). A média de alelos por *locus* correspondeu a 9,4, onde o *locus* MYR13 apresentou 17 alelos, sendo o *locus* com maior quantidade e o MYR19 apresentou apenas 4 alelos, sendo o menor resultado obtido. Outro fator importante a ser observado são as heterozigosidades observadas que variaram de 0,167 (MYR19) a 0,567 (MYR13), e as heterozigosidades esperadas variaram de 0,431 (MYR19) a 0,923 (MYR13).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) demonstra a qualidade do marcador utilizado nos estudos genéticos sendo classificado de acordo com seus níveis, valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, entre 0,25 e 0,50 medianos e inferiores a 0,25 pouco informativos (BOTSTEIN *et al*.,1980). Neste trabalho, os valores de PIC variaram de 0,38 (MYR19) a 0,90 (MYR13), apresentando uma média geral de 0,74. A média de níveis (PIC) para marcadores dinucleotídeos foi ligeiramente maior (0,79) quando comparada aos marcadores trinucleotídeos (0,70) e tetranucleotídeos (0,62). Tais números apontam para o elevado conteúdo de informação genética que os marcadores desenvolvidos podem fornecer, tendo em vista que tal valor de média de PIC é considerado altamente informativo.

O desequilíbrio de ligação (*Linkage disequilibrium*), uma inspeção realizada através do programa GENEPOP (genepop.curtin.edu.au/) aponta a possibilidade de análises dos *locus* par a par tragam alguma relação entre si, ou seja, a mesma informação, gerando resultados redundantes (WEIR, 2008). As análises de desequilíbrio de ligação entre os *loci* escolhidos estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Análise par a par realizada no programa GENEPOP para verificação dos *loci* que se encontram em desequilíbrio de ligação.

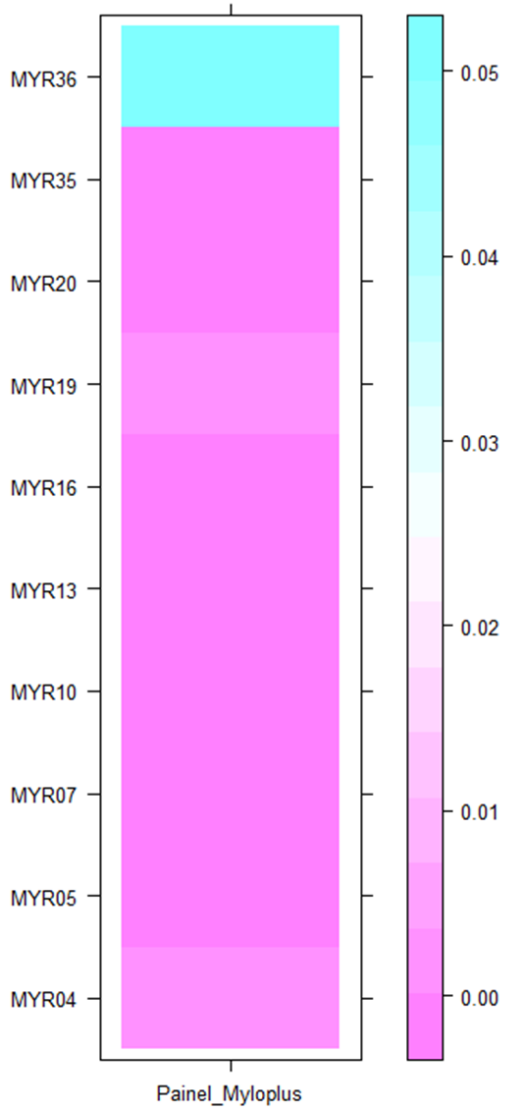
Locus#1	*Locus*#2	P-Value
MYR10	MYR13	0,00000
MYR10	MYR36	0,00175
MYR04	MYR20	0,00680
MYR07	MYR20	0,03809
MYR07	MYR36	0,05732
MYR04	MYR35	0,06320
MYR13	MYR36	0,12958
MYR04	MYR05	0,12999
MYR20	MYR35	0,13274
MYR19	MYR35	0,14824
MYR04	MYR36	0,15085
MYR35	MYR36	0,17276
MYR19	MYR20	0,21881
MYR16	MYR36	0,24232
MYR19	MYR36	0,29238
MYR04	MYR16	0,41997
MYR13	MYR35	0,42459
MYR16	MYR35	0,43173
MYR10	MYR16	0,52290
MYR10	MYR19	0,54450
MYR04	MYR19	0,55730
MYR05	MYR19	0,57476
MYR05	MYR10	0,58187
MYR16	MYR19	0,58764
MYR05	MYR13	0,65667
MYR13	MYR19	0,66768

MYR10	MYR35	0,67877
MYR04	MYR13	0,68127
MYR05	MYR20	0,68843
MYR07	MYR19	0,70620
MYR05	MYR35	0,72670
MYR07	MYR10	0,74326
MYR04	MYR10	0,76027
MYR13	MYR16	0,77846
MYR05	MYR36	0,80866
MYR07	MYR16	0,83207
MYR16	MYR20	0,87928
MYR13	MYR20	0,88271
MYR07	MYR35	0,92165
MYR20	MYR36	0,94514
MYR10	MYR20	0,94542
MYR05	MYR16	0,95832
MYR04	MYR07	1,00000
MYR05	MYR07	1,00000
MYR07	MYR13	1,00000

Na tabela 3 podemos observar que o *locus* MYR10 apresenta desequilíbrio de ligação com os *loci* MYR13 e MYR36 e o *locus* MYR20 está em desequilíbrio com os *loci* MYR04 e MYR07. Isso nos indica que não é recomendado a utilização do MYR10 e MYR20 juntamente com os *loci* citados em estudos populacionais.

Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) todos os *loci* apresentaram desvios no EHW ($p<0,05$), sendo apenas o *locus* MYR36 próximo ao equilíbrio por apresentar 0,0049. Tal resultado nos leva a rejeitar a hipótese nula de que não há diferença entre as médias e concluir que existe uma diferença significativa, indicando que as frequências alélicas observadas no painel desviam significativamente das frequências esperadas (ABRAMOVS *et al.*, 2020). Os resultados das análises EHW podem ser visualizados na figura 7.

Figura 7: Resultados de p-valor referentes ao EHW dos *loci* polimórficos



7. CONCLUSÃO

O conjunto de marcadores microssatélites desenvolvidos especificamente para *Myloplus rubripinnis*, representa um marco pioneiro para a espécie em questão. A compilação de 10 *locus* polimórficos de STR estabelece uma ferramenta robusta e eficaz para avaliar a variabilidade genética e corrobora para supervisionar a espécie.

REFERÊNCIAS

ABRAMOVS, N.; BRASS, A.; TASSABEHJI, M. Hardy-Weinberg equilibrium in the large scale genomic sequencing era. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 210, 2020.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

BEM, J. D.; RIBOLLI, J.; RÖPKE, C.; WINEMILLER, K. O.; ZANIBONI-FILHO, E. A cascade of dams affects fish spatial distributions and functional groups of local assemblages in a subtropical river. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, 2021.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.

CARVALHO, G. R.; HAUSER, L. Advances in the molecular analysis of fish population structure. **Italian Journal of Zoology**, v. 65, n. S1, p. 21-33, 1998.

CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 3, p. 621-631, 2007.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces usingPhred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007., 2007.

FAUCHEUX, N. M.; MIRANDA, L. E.; TAYLOR, J. M.; FARRIS, J. Impact of Dams on Stream Fish Diversity: A Different Result. **Diversity**, v. 15, n. 6, p. 728, 2023.

HILSDORF, A. W.S.; HALLERMAN, E. M. **Genetic resources of Neotropical fishes**. New York: Springer International Publishing, 2017.

HILSDORF, A.W.S.; RESENDE; MARQUES, D. K. S. Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas. 2006.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007.

KALINOWSKI, S. T.; WAGNER, A. P.; TAPER, M. L. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 2, p. 576-579, 2006.

KEENAN, K.; MCGINNITY, P.; CROSS, T. F.; CROZIER W. W.,; PRODÖHL, P. A. An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. **Methods in ecology and evolution**, v. 4, n. 8, p. 782-788, 2013.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético**. 2000.

LI, D.; LIU, C. M.; LUO, R.; SADAKANE, K.; LAM, T. W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674-1676, 2015.

MEMIŞ, D.; KOHLMANN, K. Genetic characterization of wild common carp (Cyprinus carpio L.) from Turkey. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 257-262, 2006.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, p. 1280-1283, 1995.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v. 109, n. 6, p. 365-371, 2000.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology letters**, v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular ecology notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

VÖRÖSMARTY, C. J.; MCINTYRE, P. B.; GESSNER, M. O.; DUDGEON, D.; PRUSEVICH, A.; GREEN, P.; ...; DAVIES, P. M. Global threats to human water security and river biodiversity. **nature**, v. 467, n. 7315, p. 555-561, 2010.

WEIR, B. S. Linkage disequilibrium and association mapping. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 9, p. 129-142, 2008.

WINSTON, M. R.; TAYLOR, C. M.; PIGG, J. Upstream extirpation of four minnow species due to damming of a prairie stream. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 120, n. 1, p. 98-105, 1991.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA CONECTIVIDADE E VARIABILIDADE GENÉTICA DO *M. rubripinnis* EM ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE USINAS HIDRELÉTRICAS NO RIO TELES PIRES

Danilo de Assunção Vitoriano[1], Letícia Rafaela de Morais[1], Caio Augusto Perazza[1,2], Alexandre Wagner Silva Hilsdorf[1]

[1]Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Caixa Postal 411, 08701-970, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

[2] Departamento de Oceanografia Biológica, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Praça do Oceanográfico, 191, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente: Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Caixa Postal 411, 08701-970, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

wagner@umc.br, +55 11 4798-7210

RESUMO

Os peixes dulcícolas de todo o planeta estão confrontando desafios significativos na era do Antropoceno. A capacidade de recuperação dos ecossistemas aquáticos, incluindo aqueles encontrados em áreas ribeirinhas e costeiras, está sendo progressivamente comprometida devido às atividades humanas que principalmente causam alterações nas propriedades hidrológicas dos rios. As Usinas Hidrelétricas (UHEs) representam uma barreira física que afeta a mobilidade dos organismos aquático, ocasionando um impacto significativo sobre os padrões de migração e conectividade de várias espécies, criando obstáculos que prejudicam a continuidade do fluxo genético entre elas. No contexto da fragmentação do rio Teles Pires por barragens, os objetivos do presente estudo foi entender a conectividade e diversidade de *Myloplus rubripinnis* em áreas de influência de barragens hidrelétricas. Para isso, um total de 70 indivíduos foram coletadas a jusante e montante da UHE Teles Pires, submetidas à extração de DNA. Análises moleculares foram realizadas utilizando-se 10 marcadores microssatélites. Os resultados de diferenciação genética indicaram a presença de duas populações geneticamente distintas, uma à jusante e outra à montante das extintas corredeiras Sete Quedas no rio Teles Pires. As corredeiras consistiam em uma barreira geográfica semipermeável ao fluxo gênico. Os indicativos de endogamia indicam que as populações possuem um nível médio de parentesco e elevado nível de endogamia. O presente estudo aponta a necessidade do monitoramento e manejo da ictiofauna do rio Teles Pires para a conservação de populações determinadas no estudo. Conclui-se que a aplicação de técnicas moleculares na conservação genética de espécies de peixes é uma ferramenta essencial para orientar políticas de manejo e conservação. Os resultados deste trabalho promovem o uso da espécie como modelo em pesquisas futuras sobre a genética da ictiofauna em regiões afetadas por usinas hidrelétricas.

Palavras-chave: ictiofauna; genética; populações; marcadores microssatélites.

ABSTRACT

Freshwater fish worldwide face significant challenges in the Anthropocene era. Aquatic ecosystems, including those in riverine and coastal areas, are seeing their recovery capacity progressively compromised due to human activities that primarily lead to changes in the hydrological characteristics of rivers. Hydroelectric power plants (HPPs) represent physical barriers that impact the mobility of aquatic organisms, significantly affecting migration patterns and species connectivity. They create obstacles that impede the continuity of gene flow between populations.Within the context of Teles Pires River fragmentation caused by dams, this study aimed to investigate the connectivity and diversity of *Myloplus rubripinnis* in the areas influenced by hydroelectric dams. A total of 70 individuals were collected downstream and upstream of the Teles Pires HPP and underwent DNA extraction. Molecular analyses were conducted using 10 microsatellite markers. The results of genetic differentiation revealed the presence of two genetically distinct populations: one downstream and one upstream of the extinct Sete Quedas rapids on the Teles Pires River. The rapids acted as semi-permeable geographical barriers to gene flow. Indications of inbreeding suggest that the populations exhibit a moderate level of kinship and varying degrees of inbreeding.This study underscores the importance of monitoring and managing the ichthyofauna of the Teles Pires River to conserve the populations identified in the study. It is concluded that the application of molecular techniques in the genetic conservation of fish species is an essential tool for guiding management and conservation policies. The findings of this study also advocate for using this species as a model for future research on the genetics of ichthyofauna in regions affected by hydroelectric plants.

Keywords: ichthyofauna; genetics; populations; microsatellite markers.

8. INTRODUÇÃO

A região neotropical é responsável por armazenar a maior ictiodiversidade do mundo, especialmente em peixes dulcícolas contendo cerca de 6.080 espécies habitando os mais diversos habitats aquáticos, ecorregiões, zonas climáticas e em maior quantidade concentrados em bacias hidrográficas da América do Sul (DAGOSTA; DE PINNA 2019; ALBERT *et al*., 2020).

Os organismos e ecossistemas de água doce em todo o mundo enfrentam imensos desafios no Antropoceno (ALBERT *et al.* 2021). A resiliência dos ecossistemas aquáticos, ribeirinhos e costeiros está cada vez mais ameaçada por atividades humanas que promovem mudanças nas características hidrológicas dos rios, poluição, introdução de espécies exóticas e nas fragmentações de habitats (PELICICE *et al*., 2017).

As barragens impostas pelas UHEs constituem uma barreira física ao movimento de organismos aquáticos, influenciando o padrão de migração e deslocamento de diversas espécies, constituindo obstáculos para a continuidade do fluxo genético entre populações a montante e a jusante das mesmas (PAMPONET *et al.*, 2008). O barramento do rio promove a alteração da composição da fauna (LOUREIRO-CRIPPA; HAHN, 2006) e pode diminuir a riqueza de espécies localmente. Além disso, pode alterar a diversidade dos sistemas aquáticos (MOL *et al*., 2007).

Com isso, a conservação da diversidade genética das populações de peixes ou outros organismos aquáticos é uma etapa fundamental para manutenção da sua viabilidade a médio e longo prazo (LEBERG, 1990), pois a diversidade genética é necessária para as populações evoluírem e se aclimatarem às mudanças ambientais (FRANKHAM *et al.*, 2008).

O uso de técnicas moleculares pode auxiliar na avaliação da diversidade genética dos organismos aquáticos (MEMIS, 2006; HILSDORF *et al*., 2006; HILSDORF; HALLERMAN, 2017), dentre os diversos marcadores moleculares, os microssatélites têm se destacado como uma das principais ferramentas empregadas em estudos sobre genética de peixes (HILSDORF, 2013; CUÉLLAR-PINZÓN *et al*., 2016).

Sendo assim, torna-se necessário avaliar a diversidade genética de peixes em rios com presença de barragens. Até o momento não há descrito na literatura, marcadores microssatélites espécie-específicos para *M. Rubripinnis*. No capítulo anterior, foram elaborados marcadores microssatélites específicos destinados à espécie em foco. Essa ferramenta foi empregada para realizar análises genéticas abrangentes, abordando tanto as

dinâmicas intra quanto interpopulacionais. O objetivo principal desse capítulo é permitir uma compreensão a respeito da situação atual das populações em estudo, além de investigar a existência de qualquer grau de conectividade entre os indivíduos que compõem essas populações.

9. MÉTODOS

9.1 MATERIAL BIOLÓGICO E PONTOS DE COLETA

A partir de pescas realizadas no Rio Teles Pires entre 01/2020 e 11/2020 pela empresa Ichthyology e Bios (Anexo 1), obteve-se total de 70 Fragmentos de nadadeiras caudais de indivíduos *M. rubripinnis*. As coletas resultaram em 36 indivíduos à jusante e 34 à montante da barragem da UHE Teles Pires (figura 7). As amostras foram armazenadas em microtubos de 1,5mL contendo etanol 95% para conservação do tecido. Posteriormente, foram enviadas ao Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA) da Universidade de Mogi das Cruzes – Campus Mogi das Cruzes (UMC-MOGI).

Figura 8: Mapa descritivo da região de estudo contendo a porção jusante e montante em relação a Usina Hidrelétrica Teles Pires



Fonte: Divisão Hidrográfica Nacional - DHN250, IBGE, 2021.

9.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo de extração salina (ALJANABI; MARTINEZ, 1997) e posteriormente, a verificação da qualidade e da integridade do material

genético foi feita por meio de gel de agarose a 1,0% e em seguida, corrido em eletroforese horizontal, utilizando marcadores de peso molecular (Lambda DNA/HindIIIFermentas, O'Gene Ruler 1Kb DNA Ladder Plus-Fermentas e Low DNA Mass LadderInvitrogen). Aspectos como a pureza, avaliada pela razão 260nm/280nm, e a concentração, expressa em ng/μL, do material extraído, foram determinados por meio de medidas de densidade óptica utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ One Microvolume. Aquelas amostras que apresentaram uma concentração alta, foram diluídas para 30ng/μL. As amostras de DNA extraídas foram armazenadas em freezer até o manuseio.

9.3 REAÇÕES DE PCR

Todos os microssatélites desenvolvidos no capítulo 1 foram utilizados para amplificação por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para um volume final de 25μL contendo: 30ng/ μL de DNA, 2,0 μL de solução tampão com cloreto de potássio KCl, 2,0 μL de dNTP à 10mM, 10mM de cada iniciador, em relação às concentrações de Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) alguns testes foram feitos variando entre 2,0 e 2,5 mM. As condições de amplificação foram utilizadas no termociclador variando a temperatura de anelamento de 54ºC a 58ºC (tabela 4), de acordo com o painel proposto.

Tabela 4: Condições de amplificação utilizadas no termociclador

Ciclos	Etapas	Temperatura (ºC)	Tempo (seg)
1x	Desnaturação inicial	95	180
35x	Desnaturação	94	30
	Anelamento	De 54 a 58	60
	Extensão	72	60
1x	Extensão final	72	420

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, e em seguida visualizados para a verificação da qualidade das bandas no fotodocumentador ImageQuant TM 300 Imager (GE HealthcareLife), utilizando o marcador de 50pb DNA Ladder- Sinapse). Após a amplificação dos 10 *loci* em todos os peixes coletados realizou-se a genotipagem das amostras.

9.4 GENOTIPAGEM

Os produtos de PCR foram genotipados, usando uma matriz de gel de poliacrilamida desnaturada 6,5% (KB plus 6,5% Gel Matrix, Li-Cor, Biosciences, Lincoln, NE, USA) pelo detector DNA Analyzer 4300, Li-Cor (IR2, Lincoln, NE, USA), utilizando o marcador IRDye®700 e iniciador cauda M13 universal descrito por Schuelke (2000). O tamanho dos alelos foi estimado pela interpolação da posição destes com os marcadores de peso molecular (50–350 bp DNA Sizing Standard IRDye®700), utilizando o programa SagaGT Client (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA). Foi realizada a conferência da marcação de alelos por diferentes pesquisadores, assim como o uso de amostras controle para reduzir o erro de genotipagem.

9.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No pacote diveRsity do programa R (KEENAN *et al*., 2013), foram analisados os seguintes parâmetros: número de alelos por *locus* (A), heterozigosidade observada (Ho) e heterozigosidade esperada (He) e para o índice de fixação (Fis) utilizou o pacote hierfstat (GOUDET; JOMBART, 2022). Para determinar a estruturação populacional por meio da análise discriminante de componentes principais (*Discriminant analysis of principal components* - DAPC) foi utilizado o pacote adegenet do programa R (JOMBART, 2008; JOMBART *et al*., 2010). Para a checagem de alelos nulos utilizou-se análises em quatro programas diferentes, sendo eles o MICROCHECKER v2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al*., 2004), Cervus v.3.0.7 (KALINOWSKI *et al*., 2007) e FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007)

A avaliação de endogamia dos animais amostrados foi realizada por simulações e estimativas de parentesco médio pelo programa Coancestry versão 1.0.1.5. (WANG, 2011). Nesta avaliação testou-se sete estimadores pontuais de parentesco rxy (EPP): (TrioML, Wang, LynchLi, LynchRd, Ritland, QuellerGt e DyadML) a fim de identificar os animais geneticamente próximos, com o propósito de excluir os indivíduos que exibiam coeficientes mais elevados.

O tamanho efetivo populacional (Ne) de cada localidade amostrada foi estimado e comparado com base no método de desequilíbrio de ligação (WAPLES; DO, 2010), usando o programa NeEstimator 2.0 (DO *et al.*, 2014) utilizando o valor crítico de rare-allele utilizado foi de 0,05. Os gráficos foram construídos com auxílio do pacote ggplot2 do software R (WICKHAM, 2016).

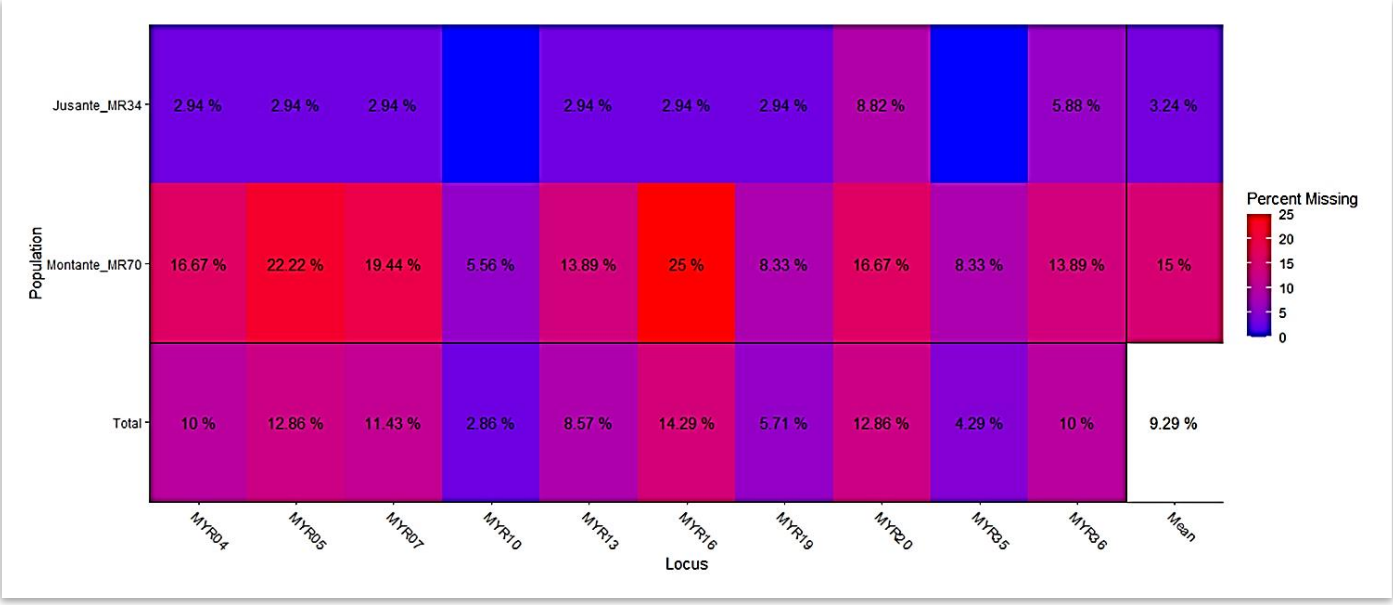
10. RESULTADOS

O painel de *loci* STR desenvolvido neste estudo (tabela 2, apresentada no Capítulo 1) foi aplicado em 70 peixes da espécie *Myloplus rubripinnis*. Desses, 34 indivíduos foram coletados a montante e 36 indivíduos a jusante da Usina Hidrelétrica Teles Pires. Os 10 *loci* polimórficos criados foram empregados com a finalidade de investigar a estrutura genética dessas populações e compreender a conectividade entre eles.

10.1 ANÁLISE E FILTRAGEM DE BANCO DE DADOS

Inicialmente, o banco de dados passou por uma avaliação, indicando uma taxa de dados perdidos (*missing data*) de 9,29% (Figura 8)

Figura 8: Gráfico de calor gerado pelo pacote *popopr* com o percentual de dados perdidos.



A variação de dados perdidos utilizando os 10 *loci* STR para os peixes coletados a jusante, variou de nenhum dado perdido (MYR10 e MYR35) a 8,82% (MYR20) obtendo uma média de 3,24% para esta localidade. No entanto, em relação aos indivíduos coletados a montante, observamos uma incidência mais significativa de *loci* com elevada quantidade de dados perdidos, variando de 5,56% (MYR10) a 25% (MYR16), resultando em uma média de 15%.

Foram aplicados sete diferentes estimadores pontuais de parentesco (EPP) em conjunto com marcadores codominantes. Na tabela 5 esses estimadores evidenciaram variações nas variâncias quando comparadas à população total, com valores variando de 0,01357 a 0,05664. Destaca-se que a variância mais baixa foi encontrada no estimador de verossimilhança triádica (TrioML).

Tabela 5: Média e variância dos estimadores pontuais de parentesco

POPULAÇÃO TOTAL							
'n=2415	**TrioML**	**Wang**	**LynchLi**	**LynchRd**	**Ritland**	**QuellerGt**	**DyadML**
Média	0.09678	-0.16118	-0.14866	-0.01918	-0.02608	-0.01958	0.09278
Variância	0.01357	0.04323	0.05664	0.01398	0.02105	0.03428	0.01399

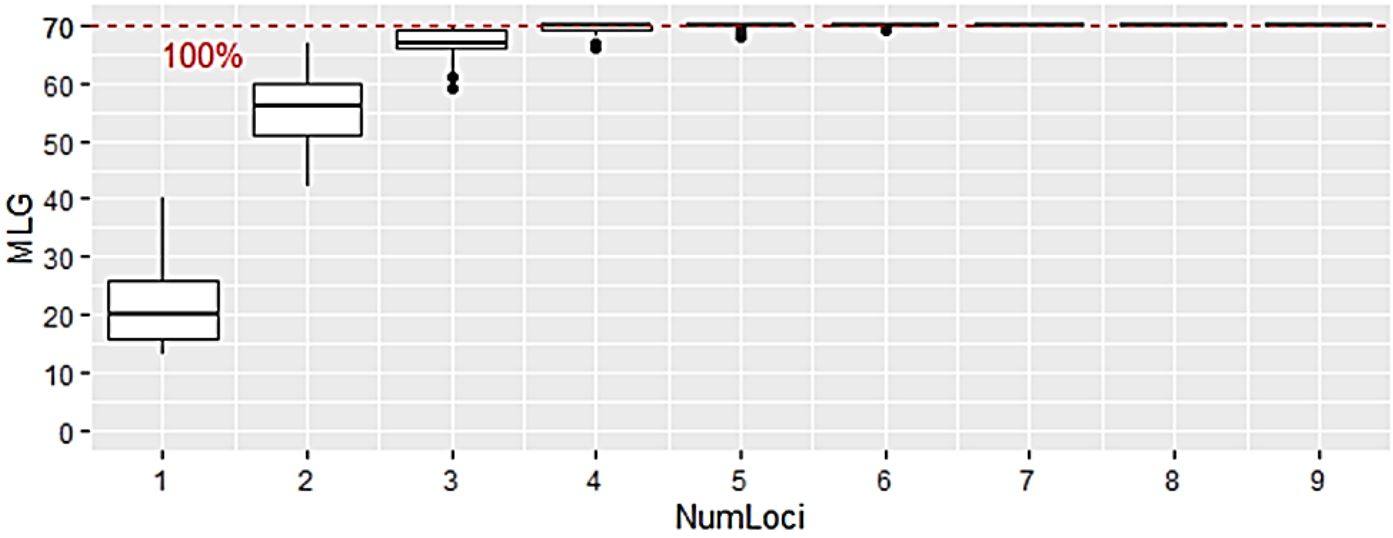
A correlação entre os índices de LynchLi e Wang foram altas (0,95534) e as que tiveram a menor correlação foram Wang e TrioML (0,73417). As altas correlações entre os EPP indicam que independentemente do método escolhido as estimativas serão semelhantes e acuradas (Tabela 6).

Tabela 6: Correlação entre os Estimadores Pontuais de Parentesco (EPP).

EPP	**TrioML**	**Wang**	**LynchLi**	**LynchRd**	**Ritland**	**QuellerGt**	**DyadML**
TrioML	100.000						
Wang	0.73417	100.000					
LynchLi	0.73431	0.95534	100.000				
LynchRd	0.78217	0.79487	0.77104	100.000			
Ritland	0.78292	0.76709	0.78829	0.90052	100.000		
QuellerGt	0.79778	0.87233	0.91950	0.82495	0.83950	100.000	
DyadML	0.94532	0.75522	0.76443	0.81436	0.81241	0.84106	100.000

Com o objetivo de assegurar a confiabilidade do painel proposto para as análises genéticas deste estudo, foi realizada uma avaliação para determinar a quantidade ideal de *loci* a serem utilizados em um estudo populacional (PRITCHARD *et al*., 2000). A análise, ilustrada na figura 9 sob a forma *boxplot*, apresenta a quantidade de indivíduos no eixo y e o número de *loci* utilizados no estudo no eixo x. É possível observar que, à medida que o número de *loci* aumenta, a capacidade de distinguir todos os indivíduos propostos melhora significativamente. Além disso, nota-se que a partir de 5 *loci*, a métrica se estabiliza, abrangendo o número total de amostras coletadas.

Figura 9: Análise de *Multi locus Genotyping* (MLG)



10.2 DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL

Os 10 *loci* polimórficos desenvolvidos foram empregados para caracterizar cada ponto amostral. Na Tabela 7, é apresentada a estatística descritiva por população e *locus* analisados. A média de alelos por *locus* variou de 8,12 (Jusante) a 10 (Montante). Quanto ao índice Fis, observou-se uma média de 0,55 a jusante e 0,56 a montante. Os valores de riqueza alélica (AR) apresentaram variação de 8,34 em Jusante a 9,69 em Montante.

Tabela 7: Estatística descritiva (N – número de indivíduos; A – número de alelos; Ar – riqueza alélica; Ho – heterozigosidade observada; He - heterozigosidade esperada; HWE - equilíbrio de Hardy-Weinberg; Fis – coeficiente de endogamia; PA - alelos privativos; PIC - conteúdo de informação polimórfica

Região UHTP		*Loci*									
		MYR04	**MYR05**	**MYR07**	**MYR10**	**MYR13**	**MYR16**	**MYR19**	**MYR20**	**MYR35**	**MYR36**
J-M*	**N**	63	61	62	68	64	60	66	61	67	63
	A	12	12	13	9	19	9	8	8	16	10
	Ar	9,85	9,0	10,98	6,99	16,56	11,66	3,90	6,79	10,85	5,99
	Ho	0,44	0,41	0,37	0,37	0,62	0,27	0,2	0,44	0,24	0,44
	He	0,79	0,84	0,87	0,8	0,92	0,8	0,64	0,72	0,79	0,78
	HWE	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	Fis	0,388	0,491	0,552	0,535	0,293	0,674	0,667	0,379	0,685	0,410
	PIC	0,77	0,82	0,85	0,77	0,09	0,77	0,59	0,69	0,78	0,75
JUSANTE	**N**	33	33	33	34	33	33	33	31	34	32
	A	10	8	8	8	14	6	4	8	9	7
	Ar	9,88	8	7,79	7,99	13,9	5,93	3,94	8	8,9	6,97
	Ho	0,64	0,4	0,27	0,23	0,54	0,33	0,12	0,45	0,26	0,19
	He	0,84	0,82	0,82	0,79	0,90	0,78	0,45	0,67	0,66	0,73
	HWE	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	Fis	0,25	0,53	0,67	0,71	0,4	0,58	0,74	0,33	0,61	0,75
	PA	11	3	11	2	19	1	0	2	10	2
	PIC	0,81	0,79	0,78	0,75	0,88	0,73	0,38	0,63	0,63	0,68
MONTANTE	**N**	30	28	29	34	31	27	33	30	33	31
	A	8	11	12	8	15	8	8	7	12	9
	Ar	7,78	10,86	11,93	7,58	14,45	8	7,54	6,89	11,69	8,61
	Ho	0,23	0,43	0,48	0,5	0,71	0,18	0,27	0,43	0,21	0,71
	He	0,6	0,82	0,9	0,81	0,90	0,84	0,75	0,77	0,87	0,82
	HWE	***	***	***	***	***	***	***	***	***	0,35
	Fis	0,62	0,48	0,47	0,39	0,22	0,78	0,64	0,44	0,76	0,13
	PA	6	7	17	1	15	10	6	0	29	6
	PIC	0,57	0,78	0,87	0,77	0,88	0,8	0,69	0,73	0,85	0,78

*J-M = Jusante + Montante

Analisando a presença de alelos privados (Tabela 8), definidos como aqueles que são exclusivamente encontrados em uma das populações, o estudo identificou um total de 52 alelos privados, sendo 18 deles associados aos peixes a jusante e 34 aos peixes a montante.

Tabela 8: Números de alelos privados encontrados em cada *loci* distribuídos nas populações

JUSANTE	MONTANTE
*MYR04.169(4)	MYR04.145
MYR04.171(2)	MYR04.151(5)
MYR04.159(4)	MYR05.147(2)
MYR04.161	MYR05.153(3)
MYR05.171(3)	MYR05.157
MYR07.178(11)	MYR05.151
MYR10.153(2)	MYR07.174(4)
MYR13.219(5)	MYR07.180(2)
MYR13.228	MYR07.184(3)
MYR13.186(2)	MYR07.162(4)
MYR13.189(11)	MYR07.172(4)
MYR16.169	MYR10.169
MYR20.243(2)	MYR13.180(4)
MYR35.193(2)	MYR13.231(4)
MYR35.133(4)	MYR13.237(3)
MYR35.153(2)	MYR13.204(3)
MYR35.145(2)	MYR13.234
MYR36.150(2)	MYR16.185(6)
	MYR16.182(2)
	MYR16.191(2)
	MYR19.147(2)
	MYR19.159(2)
	MYR19.151
	MYR19.183
	MYR35.176(4)
	MYR35.137(8)
	MYR35.181(10)
	MYR35.173(2)
	MYR35.161(2)
	MYR35.185
	MYR35.177(2)
	MYR36.164
	MYR36.182(4)
	MYR36.142

*Identificação do *locus* seguido do alelo privado o e entre parênteses o número de repetições em que apareceram

Quanto ao grau de parentesco entre os indivíduos, ao utilizarmos o estimador pontual de parentesco TrioML e compararmos separadamente os grupos de peixes a jusante e a montante e com as amostras juntas (J-M), obtivemos os resultados estão detalhados na Tabela 6.

Tabela 9: Aplicação do estimador pontual de parentesco de verossimilhança triádica nos diferentes locais de amostragem

JUSANTE	
=561	**TrioML**
Média	0.11992
Variância	0.01633
J-M*	
n=1224	**TrioML**
Média	0.07579
Variância	0.00893
MONTANTE	
n=630	**TrioML**
Média	0.11696
Variância	0.01839

*J-M = jusante com montante

Também foi possível utilizar os EPPs para avaliar a endogamia presente nos locais onde os indivíduos foram coletados. O estimador de probabilidade diádica (DyadML) foi o escolhido por apresentar uma menor variância (tabela 10) (MILLIGAN, 2003; WANG, 2007).

Tabela 10: Aplicação do estimador pontual de parentesco DyadML nos diferentes locais de amostragem para avaliar endogamia

J-M	
n=70	**DyadML**
Média	0.53941
Variância	0.04586
Jusante	
n=34	**DyadML**
Média	0.56179
Variância	0.03614
Montante	
n=36	**DyadML**
Média	0.51826
Variância	0.05411

Ao analisar o LD foi possível determinar os *loci* que apresentam o desequilíbrio por possuírem p<0,05. Os *loci* foram destacados na tabela 11 para serem evitados em estudos genéticos. Utilizando os resultados de desequilíbrio de ligação, foi possível estimar o tamanho efetivo populacional (Ne).

Tabela 11: Análise geral sobre o desequilíbrio de ligação (LD) por *locus*

Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E
MYR10	MYR13	0.048370	0.018704
MYR07	**MYR16**	0.029970	0.008434
MYR04	MYR35	0.031750	0.010917
MYR10	**MYR36**	0.002320	0.001411
MYR16	**MYR36**	0.025780	0.008336
MYR04	MYR05	0.025770	0.008811

Outra aplicação importante do desequilíbrio de ligação consiste na estimação do tamanho efetivo populacional (Ne), esse desequilíbrio ocorre exclusivamente da deriva genética para *locus* neutro desvinculado em população isolada com acasalamento ao acaso, portanto pode ser utilizado para estimar o tamanho efetivo (Ne) da população explorando sua variação ou a correlação das frequências entre *loci* (HILL, 1981).

Quanto ao tamanho efetivo da população (Ne), a tabela 12 revela uma estimativa que se encontra dentro do intervalo de confiança para a localidade a jusante. Em relação aos peixes a montante, a estimativa também está dentro da faixa, embora esteja próxima do limite inferior do intervalo aceitável.

Tabela 12: Tamanho efetivo populacional (Ne) por localidade

Localidade	**Estimado Ne^ 0,05**	**95% CIs para *Ne****
Jusante	38,8	25,9-67,0
Montante	79,1	40,7- 428,0

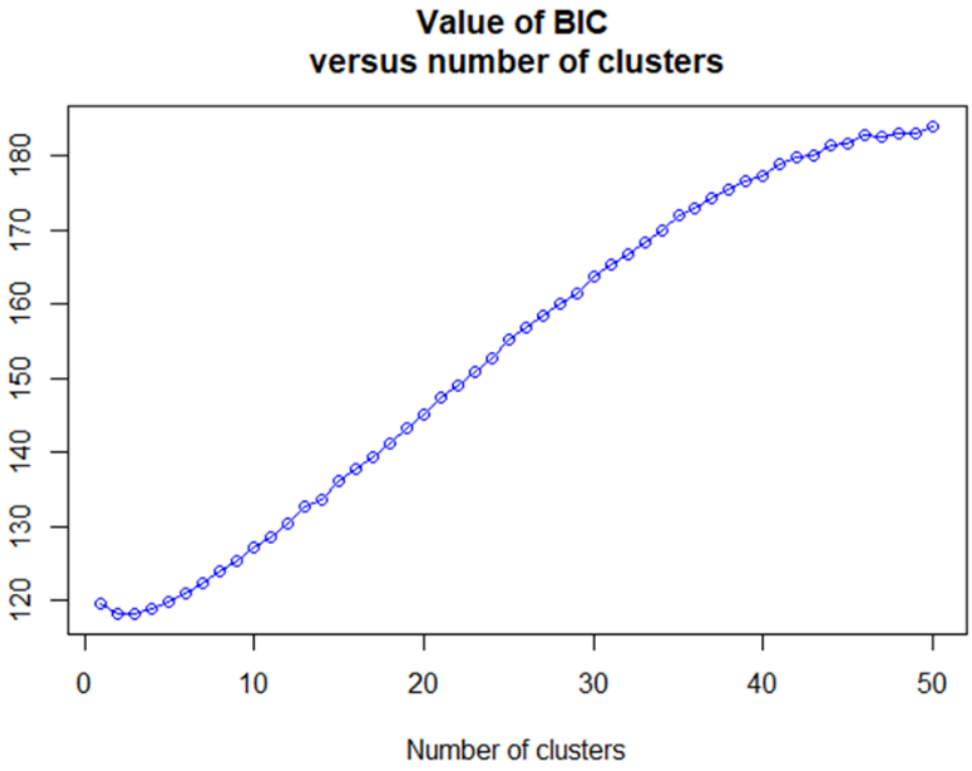
***** Número efetivo populacional (Ne), CI= intervalo de confiança. Estimativa via *Linkage disequilibrium method.*

10.3 DIVERSIDADE GENÉTICA INTERPOPULACIONAL

Para a análise discriminante por meio de componentes principais (DAPC - *Discriminant Analysis of Principal Components*), conduzimos as análises considerando toda a população, sem distinção de localidade. O objetivo era determinar quantos agrupamentos genéticos poderiam ser identificados e se esses resultados estavam relacionados à hipótese de separação das populações.

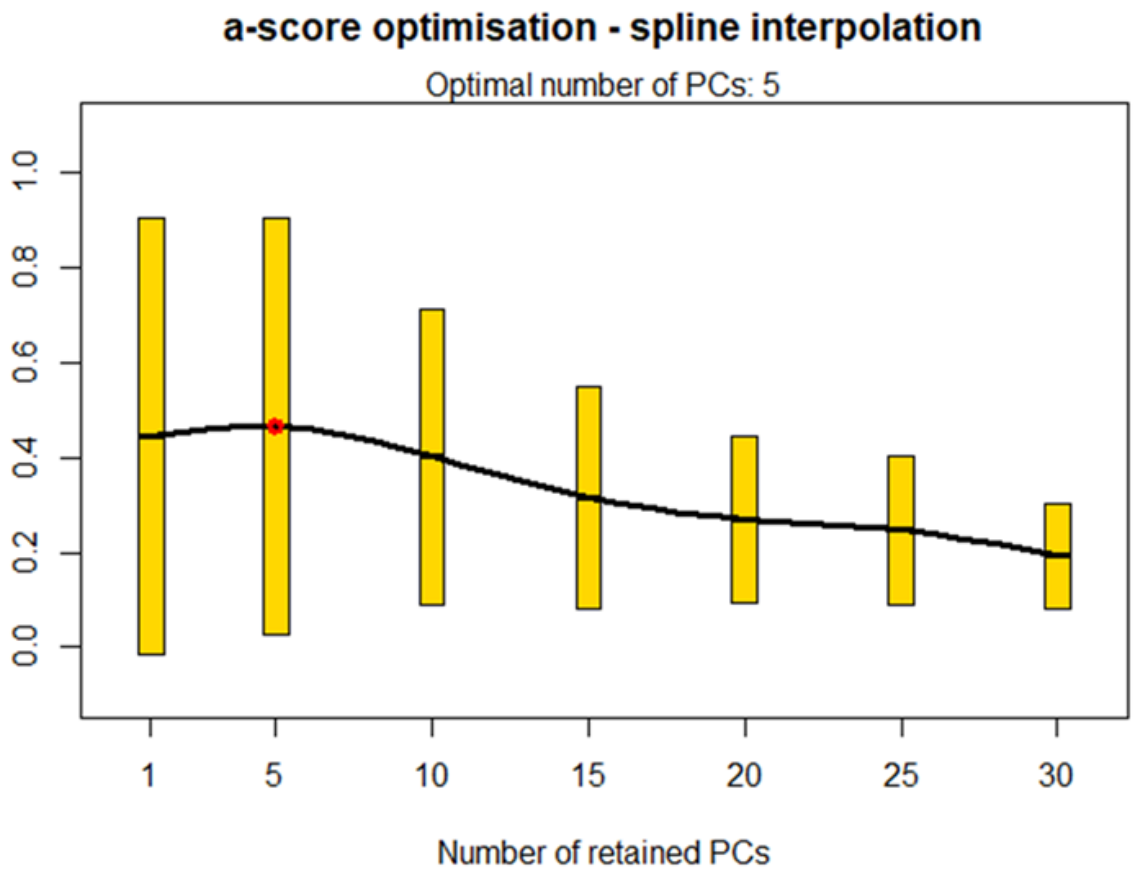
O Critério de Informação Bayesiano (BIC) é uma medida estatística aplicada na análise de agrupamentos. Ele visa alcançar um equilíbrio entre o ajuste do modelo aos dados e a complexidade desse modelo. O seu propósito é identificar o número de *clusters* que melhor explica os dados, considerando a simplicidade do modelo. A análise com k=2 revelou o menor valor (118,1185) entre cinquenta testes realizados, indicando que dois agrupamentos genéticos eram ideais para caracterizar as populações (Figura 10).

Figura 10: Valor de BIC para escolha do número de *cluster*



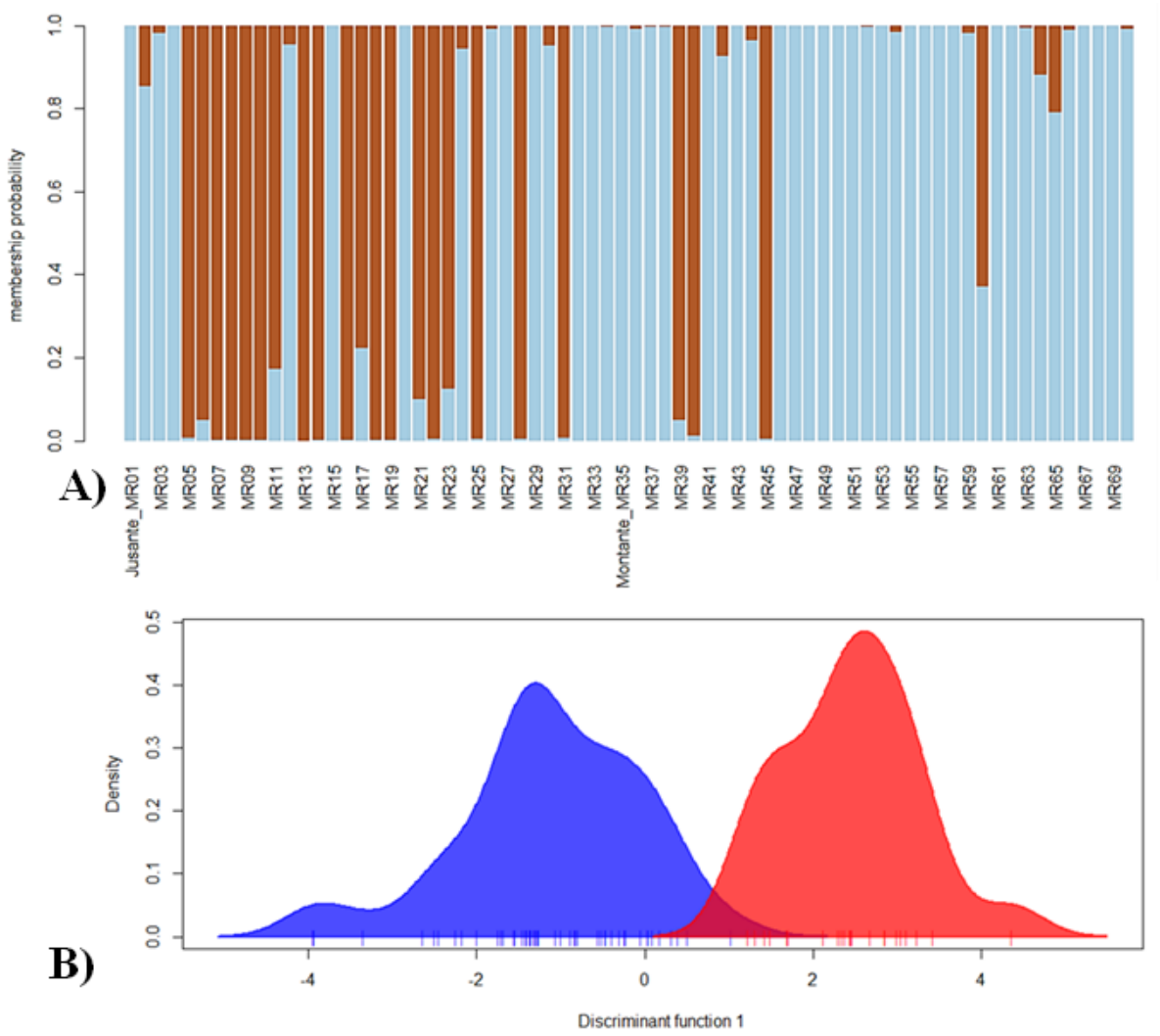
A análise de componentes principais é uma técnica estatística multivariada utilizada para reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados. Ela identifica um conjunto de novas variáveis. Essas novas variáveis são ordenadas de forma que o primeiro componente principal explique a maior parte da variabilidade dos dados, a segunda componente principal explique a segunda maior parte e assim por diante, até atingir o número ideal. Na figura 12 observamos que o pico do gráfico se demonstrou em cinco PCs, demonstrando ser o ideal para os estudos.

Figura 11: Número de componentes principais a serem retidas



Os resultados apresentados na Figura 12A são representados por barras verticais que simbolizam cada indivíduo, com diferentes cores correspondendo às probabilidades de pertencimento aos clusters genéticos. A análise revelou uma conectividade restrita entre os indivíduos, identificando claramente duas populações distintas.

Figura 12: Análise discriminante por meio de componentes principais (DAPC) para *M. rubripinnis*. Demonstrado em duas formas sendo A. gráfico Compoplot e B. gráfico *Scatterplot* onde ambos contêm informações da população a priori, demonstrando a relação entre ambas populações.



A diferenciação ocorrida entre as populações podem ser melhor representadas pelo gráfico de *ScatterPlot* (figura 12B) separando as duas populações e apresentando uma baixa conectividade em sua área central, que representa alguns indivíduos apresentam fluxo gênico com a população oposta.

Para corroborar e atestar a estruturação genética observada na análise DAPC, foi estimado o índice de diferenciação genética Dest (tabela 13) proposta por Jost (2008). Os níveis de diferenciação podem ser classificados como baixo (valores abaixo de 0,05), moderado (0,05 a 0,25) e alta (acima de 0,25).

Tabela 13: Índice de diferenciação Dest (JOST, 2008)

Locus	**Dest**
MYR04	0,52
MYR05	0,29
MYR07	0,25
MYR10	0,05
MYR13	0,53
MYR16	0,03
MYR19	0,23
MYR20	0,032
MYR35	0,29
MYR36	0,11
MÉDIA	**0,09**

O valor médio calculado para o índice Dest (0,09) revela uma diferenciação moderada, o que vai ao encontro da análise conduzida por meio do DAPC (Figura 7). Este resultado solidifica a suposição de que os peixes examinados estão sujeitos a uma barreira influente. No entanto, a observação de que uma minoria é capaz de ultrapassá-la indica que o fluxo gênico entre as populações é limitado.

11. DISCUSSÃO

A biodiversidade do nosso planeta é vasta e complexa, abrangendo uma imensidade de formas de vida que desempenham papéis cruciais nos ecossistemas. No entanto, nem todas as espécies recebem a mesma atenção e preocupação quando se trata de conservação. Entre as muitas vítimas desse desequilíbrio estão as espécies subestimadas de peixes, que frequentemente passam despercebidas nas discussões sobre conservação e gestão de recursos aquáticos (GARCEZ *et al*., 2009; HILSDORF; HALLERMAN, 2017)

Essas espécies, muitas vezes menos apreciadas ou menos conhecidas, desempenham papéis fundamentais nos ecossistemas aquáticos. Elas podem servir como papel vital na cadeia alimentar, regulando populações de presas e predadores, ou mesmo desempenhar funções essenciais na manutenção da qualidade da água. A falta de estudos em relação a esses peixes pode ter efeitos cascata nos ecossistemas, principalmente nos ambientes aquáticos.

A conservação dos recursos genéticos promove a preservação da diversidade biológica e na sustentabilidade dos ecossistemas. Cada espécie carrega um conjunto único de características genéticas que a capacitam a se adaptar a diferentes ambientes e desafios. Essa diversidade genética é a base para a evolução contínua das espécies, permitindo-lhes enfrentar as diferentes pressões ambientais (BARTHEM; FABRÉ, 2004).

Para alcançar nossos objetivos, esta pesquisa foi dividida em duas fases distintas. Na primeira fase, concentramo-nos na criação de uma ferramenta molecular capaz de avaliar a diversidade genética dos peixes presentes naquela região. Selecionamos os marcadores microssatélites, os quais passaram por análises meticulosas para avaliar a confiabilidade dos dados que seriam gerados por eles. Na segunda fase, implementamos essa ferramenta e conduzimos uma análise aprofundada dos genótipos obtidos, com o objetivo de avaliar a diversidade genética tanto dentro de populações específicas quanto entre diferentes populações. Além disso, investigamos a intensidade do fluxo gênico, o que desempenhará um papel fundamental no desenvolvimento de estratégias de manejo para as espécies nas áreas afetadas pelas usinas hidrelétricas Teles Pires.

A partir de um banco de dados com informações genotípicas de cada indivíduo foi possível identificar potenciais problemas com *loci* ou indivíduos para uma exclusão

adequada. Além disso, é importante destacar que elevadas porcentagens de dados ausentes podem ter um impacto negativo mais significativo em estudos populacionais do que os erros relacionados à genotipagem, como apontado por Reeves e colaboradores (2016). Neste estudo em particular, o banco de dados apresentou uma média de apenas baixa de dados ausentes, o que contrasta com estudos que relataram taxas de até 30% de dados perdidos (ATTARD *et al*., 2022).

Mesmo quando algumas comparações indicam porcentagens significativas, como no caso do *locus* MYR16 com os indivíduos a montante, não houve a necessidade de exclusão. Isso ocorreu porque a média dos dados obtidos, considerando todos os indivíduos, permaneceu dentro dos padrões ideais e o tamanho da amostra populacional permaneceu equilibrado. Estudos recentes sugerem que a presença de dados para 75 a 80% dos indivíduos em um determinado *locus* é adequada para a análise, caso contrário, o *locus* é excluído. Portanto, o banco de dados estava em conformidade com esses parâmetros (CATCHEN *et al*., 2013; VAN WYNGAARDEN *et al*., 2017).

Segundo Wright (1951) a estruturação populacional, inicialmente, pode levar à redução da variabilidade genética devido à diminuição da heterozigosidade nas subpopulações em comparação com a He na população original. Portanto, uma maneira de avaliar essa diversidade genética em uma população é por meio do cálculo da heterozigosidade.

A análise da heterozigosidade em *M. rubripinnis* mostrou médias de 0,38 para a população a jusante e 0,47 para a montante, indicando uma baixa presença de indivíduos heterozigotos. Esses valores contrastam com as médias esperadas de 0,75 para a população a jusante e 0,82 para a montante. Essa diferença sugere uma maior presença de homozigotos na população, indicando uma menor diversidade genética do que o esperado teoricamente, já que os indivíduos heterozigotos são cruciais para manter a variabilidade genética em populações.

Todas as médias de conteúdo de informação polimórfica (PIC) refletiram valores altamente informativos. Isso indica que esses marcadores genéticos possuem uma notável capacidade de discriminação entre diferentes alelos na população. Em outras palavras, esses marcadores são capazes de detectar e distinguir variações genéticas entre os indivíduos de forma precisa e eficaz (BOTSTEIN *et al*.,1980).

Dentre os parâmetros genéticos avaliados, o indicativo de endogamia (Fis), com uma escala de -1 a 1, reflete a estrutura de acasalamento em uma população. Valores próximos a -1 indicam acasalamentos aleatórios, enquanto valores positivos sugerem

um excesso de homozigotos, indicando desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) devido à baixa probabilidade de cruzamento entre indivíduos relacionados (FRANKHAM *et al*., 2008). Na população a montante, os valores de Fis variaram de 0,25 (MYR04) a 0,75 (MYR36), enquanto na população a jusante, variaram de 0,13 (MYR36) a 0,78 (MYR16). A presença de valores positivos de Fis em ambas as localidades indica uma predominância de indivíduos homozigotos.

A detecção desse significativo número de alelos privativos (tabela 8) corrobora com a hipótese da falta de fluxo gênico entre as populações. A falta de troca de alelos e a presença de alelos exclusivos em diferentes populações podem ser resultado de fatores como isolamento geográfico, pressões seletivas específicas ou eventos históricos que levaram ao predomínio de alelos particulares em cada população (SZPIECH; ROSENBERG, 2011).

Ao empregar o estimador de parentesco de verossimilhança triádica (TrioML), os dados apresentados na tabela 9 destacam que o grau de parentesco é mais frequentemente observado dentro das populações individuais, em vez de ocorrer predominantemente entre elas. Esse resultado indica uma tendência em direção à estruturação genética das populações.

Os *loci* que se encontram em desequilíbrio de ligação (tabela 11) têm uma alta probabilidade de estarem localizados em regiões do genoma que estão geneticamente conectadas, ou seja, não são distribuídos aleatoriamente durante o processo de meiose. *Loci* em desequilíbrio são aqueles nos quais os alelos estão estatisticamente associados, o que pode resultar na geração de informações redundantes (TENESA *et al*., 2007; HILSDORF, 2013).

Conforme definido por Frankham (1995), o tamanho efetivo (Ne) é uma medida genética que representa o número mínimo de indivíduos necessários para garantir a sobrevivência a longo prazo de uma determinada população. Refere-se ao número de indivíduos reprodutores que efetivamente contribuem para a produção de descendentes para a próxima geração. Um resultado que levanta atenção é o encontrado a montante, onde o tamanho efetivo (Ne) foi estimado em 79,1, com uma margem de variação que vai de 40,7 a 428,0. Embora este valor esteja dentro da faixa de variação, a proximidade com o limite inferior da faixa é motivo de apreensão, pois isso pode indicar um risco futuro de perda de potencial evolutivo para a população.

A diversidade genética em uma espécie desempenha um papel fundamental ao aumentar sua capacidade de se adaptar a um ambiente em constante mudança, o que é

essencial para sua sobrevivência. Essa variabilidade surge entre os indivíduos e se manifesta como diferenciações em nível populacional, entre espécies e em grupos taxonômicos diversos. Esses dados genéticos têm uma ampla gama de aplicações, sendo valiosos para investigações relacionadas à evolução, conservação e gestão dos recursos naturais, bem como em programas de melhoramento genético (MATTHEWS; McCARTNEY, 2018; MOHAMED *et al*., 2021; TRACY *et al*., 2022)

As análises conduzidas pela DAPC (Análise de Componentes Principais Discriminantes) revelaram a presença de dois *clusters* distintos, o que está em concordância com a hipótese inicial deste estudo. Esses resultados confirmam que a UHETP desempenha um papel crucial na segregação das populações de peixes. A DAPC (figura 12) reforça essa observação, exibindo a estruturação de duas populações distintas. No entanto, é importante notar que alguns indivíduos de diferentes populações conseguem atravessar essa barreira. Essa descoberta sugere que a barreira no local do rio em questão é parcialmente permeável, permitindo com sucesso a passagem de certos peixes entre as populações.

Para fortalecer os resultados obtidos pela Análise de Componentes Principais Discriminantes (DAPC), foram realizadas estimativas da distribuição da variação genética entre as diferentes localidades amostradas, utilizando a métrica Dest de Jost (2008). Essa métrica avalia a diversidade entre as populações, levando em consideração as diferenças nas frequências alélicas entre elas. Os resultados revelaram uma média de 0,09, indicando uma diferenciação moderada. Esses resultados estão em concordância com os encontrados na análise da DAPC, o que reforça a hipótese de estruturação das populações.

As barragens continuam a causar uma série de impactos significativos nos peixes de água doce e nos ecossistemas, como destacado em estudos anteriores (OLDEN *et al*., 2016; GRILL *et al*., 2019). Um exemplo recente desse impacto foi evidenciado no estudo conduzido por Liu e colaboradores (2022). Eles analisaram um rio que passou por instalações de barragens desde a década de 1990 e compararam os dados de monitoramento de peixes da região de 1965 a 2021. Os resultados revelaram a perda de espécies nativas, o aumento de espécies exóticas e a homogeneização da composição de espécies, entre outros impactos preocupantes.

11.1 A HIPÓTESE DAS CORREDEIRAS SETE-QUEDAS

As análises abrangentes revelaram uma diferenciação genética entre as amostragens realizadas a jusante e a montante da Usina Hidrelétrica Teles Pires (UHTP). Isso indica a existência de duas populações distintas: uma localizada a montante da UHE Teles Pires e outra situada a jusante. Essas duas populações representam, de fato, dois recursos genéticos separados e estruturados, caracterizados por uma conexão genética limitada entre eles.

Uma questão levantada durante a condução deste estudo está relacionada aos prazos de coleta das amostras de peixes, que ocorreram no período de janeiro a novembro de 2020, em comparação com o início das obras da Usina Hidrelétrica Teles Pires (UHE) em 2011 e seu início de operação em 2015. A janela de tempo contemplada durante esse período não parece ser uma explicação viável para ser uma barreira artificial responsável pela segregação dessas populações (CHONG *et al*.,2021). As barreiras artificiais levam muito mais tempo para causar a separação de populações e requer um período muito mais longo para ser considerada como resultado da influência da UHE Teles Pires.

Para entender a causa física por trás da segregação das duas populações, realizamos um estudo da dinâmica do rio Teles Pires. Observamos que o rio apresenta uma forte inclinação em alguns pontos que forma vários trechos de corredeiras, que são muito procurados para a pesca esportiva. Próximo à barragem da Usina Hidrelétrica Teles Pires (UHETP), encontrava-se um conjunto de corredeiras conhecidas popularmente como "corredeiras Sete Quedas". Essas corredeiras constituíam um trecho extenso (cuja primeira queda tinha 10 metros) que muitos acreditavam ser uma barreira geográfica natural para o fluxo de peixes (RIMA-UHETP, 2010).

Os estudos de impacto ambiental (EIA) e relatórios de impacto ambiental (RIMA) propostos pela UHE Teles Pires (2010) e a de UHE São Manuel (2008), dois empreendimentos hidrelétricos próximo um do outro defendem que grandes peixes migratórios não usam essa região para se reproduzirem, e não há áreas específicas para o crescimento de peixes jovens. Devido ao movimento da água, até mesmo os métodos de pesquisa científica de pesca são difíceis de serem usados lá. A área onde há mais espécies únicas, chamada de sopé das Sete Quedas, pode estar atuando como uma barreira para os peixes menores.

Um resultado intrigante envolvendo um serrasalmideo relacionando a conectividade ao impacto das corredeiras no fluxo gênico de espécies migradoras foi apresentado por Farias e colaboradores (2010). Eles inicialmente propuseram que o rio Madeira, com suas 16 corredeiras que separam a sub-bacia da Amazônia boliviana da Amazônia brasileira, poderia atuar como uma barreira geográfica para a espécie *C. macropopum* (tambaqui). No entanto, essa hipótese foi rejeitada, pois as corredeiras não representaram uma barreira geográfica significativa para o fluxo gênico do tambaqui. Observou-se que houve uma migração frequente de tambaquis da bacia da Amazônia brasileira para a boliviana. Embora tenha ocorrido fluxo gênico entre as duas regiões, isso não impediu que as populações seguissem direções demográficas distintas ao longo do tempo, tal estudo ressalta que este serrasalmideo migrador de grande porte foi capaz de atravessar as barreiras naturais impostas.

Para o levantamento do RIMA da UHETP verificou-se que a cachoeira Sete Quedas, assim como os diversos saltos e corredeiras presentes, não impedem a migração da maioria das espécies estudadas. Entretanto, 26 espécies levantadas (12%) foram consideradas dependentes de ambientes com forte correnteza e fundo rochoso, como os piaus, aracus, cascudos, acaris, pacus e algumas espécies de piabas, lambaris e jacundás.

A presença das corredeiras de Sete Quedas no rio Teles Pires, agora submersas pela construção da barragem da UHE Teles Pires, tinha o potencial de atuar como uma possível barreira, cujo impacto na conectividade entre as populações de peixes a montante e a jusante das corredeiras ainda não havia sido completamente compreendido. Essa suposição foi reforçada através das análises de diferenciação genética e dos cálculos de fluxo gênico realizados no presente estudo.

As corredeiras Sete Quedas apontam como a principal força por trás dessa segregação. É importante destacar que ainda não podemos quantificar plenamente o impacto gerado pela Usina Hidrelétrica Teles Pires (UHTP) e outros empreendimentos hidrelétricos no rio, devido à relativa novidade desses empreendimentos. Por exemplo, a UHTP começou a redirecionar o curso do rio em 2013 e entrou em operação comercial em 2015. As análises de STR demonstram essa diferenciação que se estabeleceu ao longo de várias gerações. Para avaliar a extensão da segregação que a UHTP potencialmente causará, será imperativo conduzir investigações nos anos vindouros.

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Este estudo apresentou um avanço significativo ao criar uma ferramenta composta por 10 *loci* microssatélites específicos para a espécie *M. rubripinnis*. Até o momento, não foram registrados na literatura marcadores específicos para essa espécie. Portanto, é altamente recomendável empregar esse conjunto de marcadores em futuras investigações genéticas relacionadas a *M. rubripinnis* ou até em estudos para espécies da mesma família.

- ✓ As análises da estruturação genética de *M. rubripinnis* confirmam a baixa conectividade da espécie, evidenciando uma diferenciação genética entre as populações localizadas a montante e a jusante das corredeiras Sete Quedas. Embora as populações estejam atualmente separadas pela barragem da UHE Teles Pires, vale ressaltar que essa separação ocorreu antes da construção da barragem.

- ✓ A implantação de usinas hidrelétricas requer um estudo multidisciplinar de longo prazo. A escolha do local para a construção deve considerar impactos mínimos ao meio ambiente. Selecionar áreas com barreiras naturais pode reduzir o impacto nas populações locais.

- ✓ A detecção do número de populações, diferenciação genética, direção e intensidade do fluxo gênico são parâmetros fundamentais para guiar as melhores políticas de manejo das espécies de peixes em áreas de influência de usinas hidrelétricas.

- ✓ Constatou-se que o uso de técnicas moleculares aplicadas à conservação genética de espécies de peixes se provou uma ferramenta fundamental para orientação de políticas de manejo e conservação. Os resultados obtidos no presente estudo permitem ainda seu uso futuro como modelo para estudos de investigação genética de ictiofauna em áreas influenciadas por usinas hidrelétricas.

REFERÊNCIAS

ALBERT, J. S.; DESTOUNI, G.; DUKE-SYLVESTER, S. M.; MAGURRAN, A. E.; OBERDORFF, T.; REIS, R. E.; RIPPLE, W. J.Scientists' warning to humanity on the freshwater biodiversity crisis. **Ambio**, v. 50, n. 1, p. 85-94, 2021.

ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical freshwater fishes. Annual Review of Ecology, **Evolution, and Systematics**, v. 51, p. 27-53, 2020.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

ATTARD, C. R., SANDOVAL-CASTILLO, J., GILLIGAN, D. M., UNMACK, P. J., FAULKS, L. K., BEHEREGARAY, L. B.Genomics outperforms genetics to manage mistakes in fisheries stocking of threatened species. **Biodiversity and Conservation**, v. 31, n. 3, p. 895-908, 2022.

BARTHEM, R. B.; FABRÉ, N. N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**, v. 1, p. 17-62, 2004.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.

CATCHEN, J., BASSHAM, S., WILSON, T., CURREY, M., O'BRIEN, C., YEATES, Q., CRESKO, W. A. Te population structure and recent colonization history of Oregon threespine stickleback determined using restriction-site associated DNA-sequencing. **Mol. Ecol**, v. 22, p.2864–2883, 2013.

CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 3, p. 621-631, 2007.

CHONG, X. Y.; VERICAT, D.; BATALLA, R. J.; TEO, F. Y.; LEE, K. S. P.; GIBBINS, C. N. A review of the impacts of dams on the hydromorphology of tropical rivers. **Science of The Total Environment**, v. 794, p. 148686, 2021.

CUÉLLAR-PINZÓN, J.; PRESA, P.; HAWKINS, S. J.; PITA, A. Genetic markers in marine fisheries: Types, tasks and trends. **Fisheries Research**, v. 173, p. 194-205, 2016.

DAGOSTA F.C.; DE PINNA M. C. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 2019, n. 431, p. 1-163, 2019.

DO, C.; WAPLES, R. S.; PEEL, D.; MACBETH, G. M.; TILLETT, B. J.; OVENDEN, J. R.NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary

effective population size (Ne) from genetic data. **Molecular ecology resources**, v. 14, n. 1, p. 209-214, 2014.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA; CONCREMAT ENGENHARIA E TECNOLOGIA. **Estudo de Impacto Ambiental**. 2008.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA; CONCREMAT ENGENHARIA E TECNOLOGIA. **Relatório de Impacto Ambiental.** 2010.

FARIAS, I. P.; TORRICO, J. P.; GARCÍA-DÁVILA, C.; SANTOS, M. C. F.; HRBEK, T.; ENNO, J. F. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic tudy of the keystone floodplain species Colossoma macropomum (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, p. 1129-1135, 2010.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

GARCEZ, D. S.; BOTERO, J. I. S.; FABRÉ, N. N. Caracterização das pescarias de subsistência e comercial praticadas por ribeirinhos de áreas de várzea em Manacapuru, baixo Solimões, Amazonas, Brasil. **Boletim Técnico-Científico do CEPNOR**, v. 9, n. 1, p. 43-66, 2009.

GOUDET J.; JOMBART T. **hierfstat**: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics_. R package version 0.5. 2022. Disponível em: https://CRAN.R-project.org/package=hierfstat. Acesso em: 04 jul 2023.

GRILL, G.; LEHNER, B.; THIEME, M.; GEENEN, B.; TICKNER, D.; ANTONELLI, F.; BABU, S.; BORRELLI, P.; CHENG, L.; CROCHETIERE, H. Mapping the world's free-flowing rivers. **Nature**, v.569, p.215–221, 2019.

HILL, W. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium1. **Genetics Research**, v. 38, n. 3, p. 209-216, 1981.

HILSDORF, A. W. S. **Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil.** 2013. Tese (Livre Docência em Conservação de Recursos Genéticos Animais) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

HILSDORF, A. W. S.; MARQUES, D. K. S.; RESENDE, E. K. **Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006.

HILSDORF, A.W.S; HALLERMAN, E. M. **Genetic resources of Neotropical fishes**. New York: Springer International Publishing, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Bacias e Divisões Hidrográficas do Brasil: **Divisão Hidrográfica Nacional – DHN250**, 2021. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/informacoes-

ambientais/31653-bacias-e-divisoes-hidrograficas-do-brasil.html. Acesso em: 16 nov. 2023.

JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, n. 11, p. 1403-1405, 2008.

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2010.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular ecology**, v. 16, n.5, p. 1099-1106, 2007.

KEENAN, K.; MCGINNITY, P.; CROSS, T. F.; CROZIER, W. W.; PRODÖHL, P. A. diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. **Methods in ecology and evolution**, v. 4, n. 8, p. 782-788, 2013.

LEBERG, P. L. Influence of genetic variability on population growth: implications for conservation. **Journal of Fish Biology**. v. 37, p. 193-195, 1990.

LIU, X., OLDEN, J. D., WU, R., OUYANG, S., WU, X. Dam construction impacts fish biodiversity in a Subtropical River Network, China. **Diversity**, v. 14, n. 6, p. 476, 2022.

LOUREIRO-CRIPPA, V.E.; HAHN, N. S. Use of food resources by the fish fauna of a small reservoir (Rio Jordão, Brazil) before and shortly after its filling. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 357-362, 2006.

MATTHEWS, N.; MCCARTNEY, M. Opportunities for building resilience and lessons for navigating risks: Dams and the water energy food nexus. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 37, n. 1, p. 56-61, 2018.

MEMIS, D.; KOHLMANN, K. Genetic characterization of wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) from Turkey. **Aquaculture**, v. 258, p.257-262, 2006.

MILLIGAN, B. G. Maximum-likelihood estimation of relatedness. **Genetics**, v. 163, n. 3, p. 1153-1167, 2003.

MOHAMED, K. S.; SATHIANANDAN, T. V.; VIVEKANANDAN, E.; KURIAKOSE, S.; GANGA, U.; PILLAI, S. L.; NAIR, R. J. Application of biological and fisheries attributes to assess the vulnerability and resilience of tropical marine fish species. **Plos one**, v. 16, n. 8, p. e0255879, 2021.

MOL, J.H.; MÉRONA, B.; OUBOTER, P. E.; SAHDEW, S. The fish fauna of Brokopondo Reservoir, Suriname, during 40 years of impoundment. **Neotropical Ichthyology**, 5, 351-368, 2007.

OLDEN, J.D. Challenges and opportunities for fish conservation in dam-impacted waters. *In*: CLOSS, G.P.; KRKOSEK, M.; OLDEN, J.D. **Conservation of Freshwater Fishes**, Cambridge: Cambridge University Press, 2016. p. 107–148.

PAMPONET, V. C. C.; CARNEIRO, P. L. S.; AFFONSO, P. R. A. M.; MIRANDA, V. S.; SILVA JUNIOR, J. C.; OLIVEIRA, G. C.; GAIOTTO, F. A. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax aff. bifasciatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, p. 621-630, 2008.

PELICICE, F. M.; AZEVEDO-SANTOS, V. M.; VITULE, J. R.; ORSI, M. L.; LIMA JUNIOR, D. P.; MAGALHÃES, A. L.; AGOSTINHO, A. A. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. **Fish and fisheries**, v. 18, n. 6, p. 1119-1133, 2017.

PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., ROSENBERG, N. A., DONNELLY, P. Association mapping in structured populations. The American Journal of Human Genetics, v. 67, n. 1, p. 170-181, 2000.

REEVES, P. A.; BOWKER, C. L.; FETTIG, C. E.; TEMBROCK, L. R.; RICHARDS, C. M. Effect of error and missing data on population structure inference using microsatellite data. **bioRxiv**, p. 080630, 2016.

SZPIECH, Z. A.; ROSENBERG, N. A. On the size distribution of private microsatellite alleles. **Theoretical Population Biology**, v. 80, n. 2, p. 100-113, 2011.

TENESA, A.; NAVARRO, P.; HAYES, B. J.; DUFFY, D. L.; CLARKE, G. M.; GODDARD, M. E.; VISSCHER, P. M. Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. **Genome research**, v. 17, n. 4, p. 520-526, 2007.

TRACY, E. E.; INFANTE, D. M.; COOPER, A. R.; TAYLOR, W. W. An ecological resilience index to improve conservation action for stream fish habitat. Aquatic Conservation: **Marine and Freshwater Ecosystems,** v. 32, n. 6, p. 951-966, 2022.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICROCHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.

VAN WYNGAARDEN, M., SNELGROVE, P. V., DIBACCO, C., HAMILTON, L. C., RODRÍGUEZ-EZPELETA, N., JEFFERY, N. W.; BRADBURY, I. R. Identifying patterns of dispersal, connectivity and selection in the sea scallop, Placopecten magellanicus, using RADseq-derived SNPs. **Evol. Appl**, v.10, p.102-117, 2017.

WANG, J. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. **Genetics Research**, v. 89, n. 3, p. 135-153, 2007.

WANG, J. COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 1, p. 141-145, 2011.

WAPLES, R. S.; DO, C. H. I.Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. **Evolutionary applications**, v. 3, n. 3, p. 244-262, 2010.

WICKHAM, H.; CHANG, W.; WICKHAM, M. H. Maintainer Hadley. Package 'ggplot2'. Create elegant data visualisations using the grammar of graphics. **Version**, v. 2, n. 1, p. 1-189, 2016.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of eugenics**, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1949.

ANEXOS

Material complementar 1: Informações das coletas de *M. rubripinnis* prestadas pelas empresas Ichtyology e Bios realizadas ao longo do ano de 2020.

ID_Gen	Data	Empresa	Localidade	Montante ou Jusante da UHETP	ID Definitiva	ID LAGOAA
GEN-01	16/01/2020	Ichthyology	Jusante Taxidermista	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR01
GEN-06	17/01/2020	Ichthyology	Montante Cristalino	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR02
GEN-07	17/01/2020	Ichthyology	Montante Cristalino	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR03
GEN-08	17/01/2020	Ichthyology	Montante Cristalino	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR04
GEN-14	17/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR05
GEN-15	17/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR06
GEN-16	17/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR07
GEN-117	17/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR08
GEN-18	17/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR09
GEN-19	17/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR10
GEN-20	17/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR11
GEN-21	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR12
GEN-22	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR13
GEN-23	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR14
GEN-24	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR15
GEN-25	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR16
GEN-26	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR17
GEN-27	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR18
GEN-28	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR19
GEN-29	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR20
GEN-30	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR21
GEN-31	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR22
GEN-32	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR23
GEN-33	18/01/2020	Ichthyology	Balça do Cajueiro	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR24
GEN-37	19/01/2020	Ichthyology	Paranaíta Jusante	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR25

GEN-38	19/01/2020	Ichthyology	Paranaíta Jusante	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR26
GEN-40	19/01/2020	Ichthyology	Paranaíta Jusante	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR27
GE-03	23/05/2020	Ichthyology	Montante Cristalino	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR28
GE-07	23/05/2020	Ichthyology	Cristalino	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR29
GE-08	23/05/2020	Ichthyology	Cristalino	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR30
GE-09	23/05/2020	Ichthyology	Cristalino	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR31
GE-10	24/05/2020	Ichthyology	Paranaíta Montante	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR32
GE-11	24/05/2020	Ichthyology	Paranaíta Montante	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR33
GE-14	24/05/2020	Ichthyology	Paranaíta Montante	Montante	*Myloplus rubripinnis*	MR34
SM-JAN-20-GEN-13	28/01/2020	Bios	TP08	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR35
SM-JAN-20-GEN-14	30/01/2020	Bios	LG TUC 01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR36
SM-JAN-20-GEN-15	31/01/2020	Bios	LG TUC 01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR37
GN02	24/09/2020	Bios	TP07	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR38
GN03	24/09/2020	Bios	TP07	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR39
GN04	24/09/2020	Bios	TP07	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR40
GN05	24/09/2020	Bios	TP07	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR41
GN06	25/09/2020	Bios	TP08	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR42
GN07	25/09/2020	Bios	SB01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR43
GN08	25/09/2020	Bios	SB01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR44
GN09	25/09/2020	Bios	SB01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR45
GN10	25/09/2020	Bios	SB01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR46
GN11	25/09/2020	Bios	SB01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR47
GN14	27/09/2020	Bios	TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR48
GN15	27/09/2020	Bios	TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR49
GN16	27/09/2020	Bios	TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR50
GN17	27/09/2020	Bios	TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR51
GN19	27/09/2020	Bios	TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR52
GN20	27/09/2020	Bios	TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR53
GN21	27/09/2020	Bios	TP02	Jusante	*Myloplus*	MR54

					rubripinnis	
GN22	27/09/2020	Bios	TP02	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR55
GN23	27/09/2020	Bios	TP02	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR56
GN24	27/09/2020	Bios	TP02	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR57
GN25	27/09/2020	Bios	TP02	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR58
GN28	29/09/2020	Bios	LGTC1	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR59
GN29	29/09/2020	Bios	LGTC1	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR60
GN30	29/09/2020	Bios	LGTC1	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR61
GN31	29/09/2020	Bios	TP03	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR62
GEN14	26/11/2020		TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR63
GEN15	26/11/2020		TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR64
GEN16	26/11/2020		TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR65
GEN18	26/11/2020		TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR66
GEN19	26/11/2020		TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR67
GEN21	26/11/2020		TP01	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR68
GEN25	27/11/2020		TP02	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR69
GEN28	28/11/2020		LGTUC	Jusante	*Myloplus rubripinnis*	MR70

Material suplementar 2: Relação de primers de *M. rubripinnis* prospectados pelo *BatchPrimer 3*

ID do Iniciador	Forward	Reverse	Motif	Tamanho STR	Amplicon
k141_11042	GCTTAGCCAACCCTAAACA	CTGCACCTTTCTGAACTGA	TAA	18	152
k141_11512	CTCCTGGGAGATGATGAGT	ATAGAGGCAGATTGGGACA	TC	52	138
k141_11777	GCTCTCTCTCTTCCCTCCT	CACCTGAACAGCCTTACAA	TC	34	162
k141_12301	TGGAGGGAGAGAGAGAGAG	CGAGAACTTTGAGGAGCTT	GA	24	148
k141_12383	TGTGTGCTGTCATCTCCTC	GTCACCACCTGTCACTCAA	AC	36	149
k141_12620	CCATTTGCTTACAAGTTACC	CAACTACTGAACATTCTGCT	TAC	18	176
k141_12918	CCGTAAATCATTACCAACAA	AACAACAACCACCACAACA	TAA	42	209
k141_12918	CCGTAAATCATTACCAACAA	CAACAACCACCACAACATT	TTA	18	207
k141_13008	GCTGAAACTCTCTCCATCC	CTTGCTGCCTCTCTCTCTC	AG	24	164
k141_13142	TGTGTGTGCATCTGTGTCT	AGGATTTCATAGGGTGTCC	TG	22	142
k141_13200	TCAGTTGAGAGTCCCGTTA	TCCTTCACCTTAATCTGTCC	GA	50	157
k141_13315	CCAACAGCAACAAGATCAC	GACAGACAGAGAAAGACAGC	GTCT	32	146
k141_13329	CTGAAGGAACCGAAAGAGT	CCCAAACACACACATCTCT	TG	36	150
k141_13498	TCTGCTGAAAGATTTGGTG	AGAGGGAGAGAGAGGGAGA	CT	40	150
k141_13554	TCTCCCTCTCTCTCCCTCT	GGTTAAAGGGGAAACTGTG	CT	22	146
k141_13565	CCACACAAACACACACACA	AGCCTGTTACTGCTCACTG	CA	22	173
k141_13576	GCTGTGAGGCTACAAAGGT	CAACAACAACAACAACAACA	TAT	55	151
k141_13678	TGACCTGCTCATCTGTCAT	TGTCTCTGAAGTGTGCTCTG	CA	22	156
k141_13731	CCGATCAGATCTGCATTAC	TCCCATCTCACACACACAC	CA	40	147
k141_13910	GGTTCCATTGACTTCCATT	GCCTGCTAAGTGTGTGTGT	ATGT	28	168
k141_16916	GGACGCTGACAGTAGTGC	TGTATGTGTTTCGCTGTCA	GA	55	154
k141_17142	TAGTAGTGCCTGGCTGTTG	AGAACTCTGCCTGAAATGC	TTA	33	152

k141_17403	AGAGTCCACAGAGGCAGAC	CCTCCTCCTTCCTTTCTCT	GGT	18	157
k141_17754	AGACAGGGAGGGATGAAG	GCTGCTCTCACACAGTCAA	GA	24	148
k141_17832	CGGCTGTTAATAACGTATCC	TTTCTCTCTCGCTCTCCAT	GAG	18	148
k141_17843	GGATACAGCCTGGACAGTT	CAGTTTCCTCCCACAGTCT	CAC	18	138
k141_17887	TCTCTCCCTCCCTCTCTCT	GGCTAAATGGGTGAAGAAG	CT	20	153
k141_17892	GAGTGTTCATGTCCATCCA	TTCCTGTGGTGACTGAGAA	AC	34	143
k141_19514	GTCCTCTCACAGCTTCTGG	AGGGAGGGAGGGAGAGAG	CTCC	28	177
k141_22489	GTGTGTCTGAGGCTCTGTG	ACCTGACCACATCATTCCT	AG	24	161
k141_22654	CTGCTCTAACCGAAGAACC	TGTCCGTCTGTCTGTCTGT	CAGA	24	144
k141_23048	TCTGCTGTTACTCGTTCCA	CAAACTCTTTGTTCGTGTCA	TCC	39	158
k141_23137	GCCCAGGTCTAGTCACAAC	GCTTCATCACACCAGAGAA	TAT	42	177
k141_23236	AGCTGAGGACCTCTGTGAG	CACACGAGCCGAACTTAT	TG	30	150
k141_23547	TGACATCTTTGGCTCGTTA	TGGAAGGATAGAGGGAGTG	CTC	36	145
k141_23590	ATCACAAGTGTCCAGCGTA	GCCTGCTGCTAGTGTGTAT	CA	26	140
k141_23616	TTCTGTGAGGAGAAGACGA	GTGAGCCTTGGGTAAAGAG	AG	28	160
k141_23683	GAGGAAGGAAGGGAGAGAG	AGGGATGGAGTATTTGCTG	GA	22	150
k141_23810	GAAGGGAAAGTGGCTTAGA	CAGGAGCTTGTGGTTGTTA	TGT	18	150
k141_24262	GGATTGGGGTACAAAGAGA	AACAATGACCGACTTCACA	AC	20	149
k141_24301	GGTTAGAGGGAGTCATGGA	ATGTGTCCATCCATCCAG	GATG	24	181
k141_24452	ATAACACTCCTGACGGAAA	CATTTGTCCACACAATGCT	AG	44	154
k141_24506	GGCTGCATTTAAACATGG	TGATCAAATGTGGTCTTGG	ACA	18	137
k141_24759	AGTCGTTGTCAGTGGTACG	GTGTGATGTCTGTGGCTGT	TG	38	145
k141_25027	TGGAATTAGACGCTGTACG	TATGTGATTGGTGGGAGTG	CA	40	151
k141_25078	TGGCAGATATGGTTTATCG	GCATGAAACAGAGCAGAAA	ATC	24	177
k141_25123	TCCTCACAGTCTCCCTTCT	GCACTGTATGGCCTTCATA	GA	34	153

k141_28240	ACTGTGAGGGAGTCTGAGC	TATAAAGGGCTGCTGGTGT	AC	26	151
k141_28626	CTGTTTGGATGGAGAGAAAG	ATTGGCAGCACTGTATGAA	GA	32	148
k141_28816	TATCCTGGGTGTGTACGTG	GATTGTATGTGTGGGCAAC	GT	20	150
k141_28992	TAAGGTGAGGGTCGTTAGC	CCATGGCTAGGAAGAAGAG	GCT	18	194
k141_29040	ACCATCGTCAAACAAGTCA	ACAAAGCTGTGCAAGTTCA	GT	26	148
k141_29050	CACTTGTTGAGGCTGACAC	TCAGTCAGGAGATGCTGTG	GA	18	150
k141_29076	ATGTGCTTATACCAGACCTC	GCAGAGAGAGAGGGAGAGA	CT	28	187
k141_29078	ATGATGATGATGCTGATGC	TTACGTCTCGGTAATCGTCT	TGC	18	149
k141_29409	CACTTTGAGCTACCACCAG	GCCACATGCTGAAGTAATG	TAT	18	130
k141_29411	GGTTCAGTTTGGACTCGTT	CCATCTTGCTTTCTGGAAT	TC	20	151
k141_29472	GAGAGGAAGAGAGCGAGAG	GATGGTGAAAGACGGAAAT	GA	34	153
k141_29544	GCTCTTGGTTTGGTTCTCT	GAACTGTCACTTTGGTGGA	TC	46	154
k141_29646	ACCCTATGCTGGACACTTG	CCTTGTGTGGTGTTGATGT	AT	22	147
k141_29691	TACTCAGCTCACGTCAACC	AACTTCTTTCGATGCCCTA	AAAT	24	137
k141_30143	CTGTCTCCTGGGATAAGGA	CCATGTGATTGGCTGATTA	AAT	36	142
k141_30175	GGAAACATCGGAACTTAGC	TCCACTAACACCGCTACTG	TC	22	139
k141_30405	TGTGGAAGGTAGGTGTGTG	TCCACTTATTAGGCCAAGG	TAA	45	177
k141_30405	TTCTCACCCTTCTCCTTTC	CTCCTGGTAGCCATTAAGC	AC	18	163
k141_30600	AGAGAGCGAAGAACAGACA	CCTCTCTCCCTCTCCTTCT	GT	56	148
k141_30706	ACATCTCTGCCTCCTCAAC	TGAGTTCATAGCCACTGTCA	AC	28	159
k141_30708	GCCCTCCATACACAACTTT	CTCCCACTGTCTTCCTCAT	AAT	45	214
k141_30891	CACAATGAGAACACGCTATC	CAGAACAGAGCAGCGATAA	CT	30	154
k141_30994	TGCTGTCTCTGCTCTTCTG	GGACGCAGGAGAAAGTTAG	TC	26	150
k141_31047	ATACCAGCATTAGCGTGTG	GTGAGTGAAGGGAGGTGAC	GT	30	147
k141_31298	ACACACACAAACAGACACAT	GGGCTTACTGGTTAAACAAA	AT	22	124

k141_31435	CTTTCATCCAGCGTGAGT	AGGAAGCCATCAAGAACAG	TG	24	156
k141_31435	CCAGACACTTCACAGCACT	CTCTCTCCAGGGTTATCCA	AC	18	149
k141_861	CTCCATTTCCCTCTCTCTG	GTAGAGCGGCTCAGTGAAT	TC	6	170
k141_1099	CAAGCAGAACCACTCCATA	TGGTGGTCAGAACAATTTG	AC	6	177
k141_2873	CATGCGCAGGATAAATTAG	AAAGGGACACTGCTGTCTC	TG	10	197
k141_3563	AATACAGAGGACGCAAAGG	TGTGGTAATAACGGTGTGG	AG	7	157
k141_4502	ACGACAAACCTTCCATTAAA	GAAAGGGAGAAAGAGAGCA	GA	17	146
k141_4685	TCATTTCCCTTGACCTGAC	GCTTTCTTCTGCATTGTCTC	AC	6	164
k141_4813	ACGGTCAAAAATTCCCATA	ATGAGCAAATACATTTGGC	GT	7	164
k141_5913	GGAACCAGAATTTTCTCCA	CAATACAGCGTCAATTCGT	TA	6	152
k141_6184	CAGCACCAGATCATTTCAA	TCACACACACTCAAACGAA	CA	9	148
k141_6968	GAGGTCACTGTCACCAGAA	GCAATTCTCAGCGTTTGTA	TA	6	148
k141_594	ATGACCTTCCCTGTCTTGT	ATGACCTTCCCTGTCTTGT	TAT	5	149
k141_759	CACTCTTGCAGTTCCTTCA	TTGTCTCGGTGCAATTTAA	TTA	5	150
k141_1323	CAGAATCTGACTCCCCTTC	CACCTGTTCAATTGCTTGT	ATT	4	141
k141_3166	AATTCCCCTTTAAAGTGCTC	ACATCCCTAAACCTCAACG	ATT	4	144
k141_3700	GGACCAACAAACCACTCTT	AACAGCATCAACAGTTGGA	CAG	4	168
k141_3914	ACCAGCAACTTCCTACGAT	GGATTCAGTGAAGGGCTTA	ATA	4	161
k141_5898	AGCCACATTCTGCATACAA	AGACACAGAAGTGCTGCAG	TGG	4	141
k141_7969	TCCGAGTACATTGATGGAA	ATTTACAGCTTTGGCAACA	ATT	5	153
k141_8059	TCTGGTCGACACTGGATAA	ACAGCGTTACACAGCAAGA	GCA	4	164
k141_8073	CCATCAGCCAGAAGAATG	GCACAGTTACAAATAAGCCA	ATA	6	219
k141_9271	GCCATGATATTGGTCGTTT	GATGACGATGGTATAATCGG	ATA	10	150
k141_357	CCTGCATGACACTGGATTA	TAGGTCCTCACATGAAAGC	ATAC	3	131
k141_887	CAAAGGAATCAAAGGAGAAA	ACTTGAGGCTTAATGGAGG	AAGA	4	147

k141_1932	TTTTGGTTTGTCCATCTGA	CTCACATGAACAGAACGTGT	ATTT	3	132
k141_2293	ATTCTCTGCTCTCCCAACT	TTACCTCTTGTAAGCATTCA	GATG	6	146
k141_4946	GAGATGCGTTACAGTCACC	ACAAACAAGTCACACTCGC	CACG	3	156
k141_5761	CATACCCCTCGTTTTCAAC	TGGTTTTACGGGTCAAATT	ATAA	3	150
k141_6383	GCAGTGAGATAGGGAAGGA	CAAAGAGAAACAGAGACCA	AGAA	3	156
k141_7323	CCACAACATCACAGACCAT	TCTGAACATGGTACACGGT	TTTG	3	134
k141_9024	TTGCACATGACCTCTTCAT	CTCACATTCAGAGAGCCAA	TGAT	3	169
k141_9753	ATTGTTTGCTTGGGCTATG	CTTAATCCAGAGAGGGTCG	TCCA	4	151
k141_10050	TCACGACTGAAACATTTGG	TGGACAGACAGACAGAGATG	AAAG	6	186
k141_10787	ATACGACTGGAACCGAATC	TCTGTTTCTGTTCCCCTTC	TGTC	4	149
k141_11419	AAATCCAGGGTCGTAGTCA	ACAAAGACCGACAAACACA	AAAC	3	154
k141_34706	AAGAAAGAAATGGCATGGT	GATCCTCAAACTGCTCCAT	GT	22	142
k141_34733	TCTCTGCAGCTCTTTCTCA	GATTAGAGCAGTGTGGGAGA	CT	26	149
k141_34735	GCACCAATCTCCTCTTCAT	TCTCAGCATCCCTGATACA	GAT	18	160
k141_34857	CTGCAGACAGAAAATCCAG	TGATCAGTTCGCTCCTGTA	GT	38	208
k141_34857	ACATTCATTAACCCGCTTC	TGCTGAAATCAATCACGTT	TAA	39	147
k141_34988	TCCCTGCTCATACCATACA	GGAATAATGCATTTGCTTG	AC	28	127
k141_35096	CACACACAGATAGGCCAAG	TTCAGGCAGACTGTCACAT	CA	28	159
k141_35168	GGGAGAGAGAGAGGGAGAG	ACCATCCCATTTAATCCAG	GA	46	165
k141_35383	AGTGATGAAGCGAACACTG	AAGAAGGGAGAGACCATGA	CT	38	154
k141_35459	ATCAGGATGAAACCAGGAC	TGTGTTTGGATCCAGAGTG	AC	30	158
k141_35504	TCCTACCTCCCTCACTCAG	CACTTTGGTGTTTCACTGC	AC	28	161