

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



## TESE DE DOUTORADO

# **Análise da variabilidade genética de *Prochilodus* spp. (Prochilodontidae) das bacias dos rios Paraopeba, Pará e Grande, utilizando marcador de complexas repetições hipervariáveis**

**ORIENTADA: Tatiana Moura Barroca**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis**

**BELO HORIZONTE**

**Abril - 2012**

**Tatiana Moura Barroca**

Análise da variabilidade genética de *Prochilodus*  
spp. (Prochilodontidae) das bacias dos rios  
Paraopeba, Pará, e Grande, utilizando marcador de  
complexas repetições hipervariáveis

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Genética do  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas  
Gerais com requisito parcial para obtenção de título de Doutora em  
Genética

Orientador: Prof.Dr. Evanguedes Kalapothakis

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Geral  
Belo Horizonte  
Abril de 2012

À minha família, especialmente ao meu marido e filha,  
Cláudio e Gabriela.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu amado Claudio, pelo apoio incondicional e por estar sempre tão presente. Sem você eu não conseguiria. E à minha querida Gabriela que torna meus dias mais felizes. Amo muito vocês!

À minha família pela constante ajuda. Meus pais pelo exemplo de vida, pelo amor e suporte sempre.

Ao meu querido orientador e professor Dr. Evanguedes Kalapothakis pela oportunidade, confiança e ensinamentos. Você é minha referência profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em genética do Departamento de Biologia Geral pela presença de professores e funcionários que contribuíram de alguma forma para a minha formação e, especialmente, ao Coordenador Prof. Eduardo Tarazona.

À banca examinadora, pelo aceite do convite.

À CEMIG pelo financiamento do projeto no rio Grande e em especial aos biólogos João de Magalhães Lopes e Alessandra Bedore que contribuíram de forma determinante para o desenvolvimento do mesmo.

À Retiro Baixo Energética S/A pelo financiamento do projeto no rio Paraopeba e em especial ao biólogo Vasco Torquato que contribuiu de forma significativa para o desenvolvimento do mesmo.

Ao professor Dr. Jorge Dergam por ser sempre tão prestativo e me auxiliar na interpretação dos resultados do rio Paraopeba. Obrigada por estar sempre tão disponível.

Ao professor Dr. Gilmar Santos pelo auxílio na ecologia e zoologia das curimbas do rio Pará e pela coleta de material. Obrigada por me ajudar a solucionar minhas dúvidas.

Ao Dr. Yoshimi Sato por contribuir com este trabalho nos fornecendo dados sobre o histórico de repovoamento do rio Pará.

Ao Dr. Fábio Arantes pelo auxílio na ecologia e zoologia das curimbas do rio Paraopeba e pela coleta de material.

Ao professor Dr. Alexandre Godinho pelo auxílio na ecologia e zoologia das curimbas do rio Grande e aos seus alunos pela coleta de material.

Ao biólogo Douglas Ribeiro pelas coletas em Volta Grande e Igarapava.

Ao pessoal da Estação Ambiental de Volta Grande/CEMIG pelo auxílio nas reproduções de curimatã e por todo o apoio proporcionado à nossa equipe todas as vezes que estivemos lá.

Ao professor Jorge Dergam, Carlos Bernardo (Cacá), Alessandra Bedore, Tiago Pessali, Luiz Gustavo Silva e ao comitê de bacias hidrográficas do rio Pará pelas fotos.

Ao Gilberto Salvador pelo mapa do rio Pará.

À Izabela Sousa e Udson Santos pela vetorização dos gráficos e das árvores filogenéticas.

À Bárbara de Freitas pela ajuda especial no desenvolvimento deste projeto.

Aos alunos de iniciação científica Willian Castro, Daniel Dutra e Romina Barbosa, estagiários que trabalharam muito neste projeto.

A todos os técnicos do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares pela participação neste projeto.

À Izabela Sousa, Marcelle Oliveira e Flávia Siqueira pela ajuda na revisão e formatação da Tese. Obrigada meninas!!!

Aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares. De alguma forma, todos vocês contribuíram para a elaboração deste trabalho e tornam o nosso laboratório um ambiente agradável para trabalhar.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração principalmente nestes meses tão cansativos.

## Resumo

Nas últimas décadas, muitos rios vêm sendo represados para a construção de usinas hidrelétricas, transformando-se em uma sucessão de reservatórios. As represas causam impacto negativo significativo sobre as populações de peixes locais. Além de alterações no regime hídrico e bloqueio de rotas migratórias de peixes reofílicos, uma das conseqüências do barramento é o isolamento de populações nativas, podendo levar a efeitos como perda de variabilidade genética e depressão endogâmica, e a uma conseqüente redução do valor adaptativo médio populacional, aumentando o risco de extinção local de espécies de peixes. Diante desse contexto, é de grande relevância a realização de estudos populacionais de espécies cujos habitats sofreram fragmentação devido à construção de usinas hidrelétricas. Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados neste tipo de estudo por apresentarem alto grau de polimorfismo, permitindo avaliar a estrutura e variabilidade genética de populações de peixes bem como o impacto que as barragens e o repovoamento causam sobre elas. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade genética e estrutura populacional de três espécies de peixes do gênero *Prochilodus* (*P. costatus*, *P. argenteus* e *P. lineatus*) em três Bacias Hidrográficas do estado de Minas Gerais: Bacias dos rios Pará, Paraopeba e Grande, que nas últimas décadas foram alteradas pela construção de diversas represas. A partir de 71 clones previamente isolados da biblioteca genômica de *Prochilodus lineatus* existente no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, 8 foram selecionados para a padronização da PCR, onde foram determinadas as melhores condições de amplificação para cada locus. Posteriormente o marcador de complexas repetições hipervariáveis 2V35 foi testado em 252 indivíduos de *Prochilodus* spp coletados nas três bacias mencionadas anteriormente. Sua utilidade em estudos de genética de populações foi verificada através de análises de índices de diversidade, além da análise de partição da variabilidade genética (AMOVA), isolamento por distância e análise filogenética. O seqüenciamento do marcador 2V35 permitiu que o caracterizássemos como uma região polimórfica, amplificando fragmentos variando de 460-469 pb em todas as 252 amostras de *Prochilodus* spp sendo constatado apenas um haplótipo compartilhado pelas três espécies (Hap 1) provando-se o alto grau discriminatório do marcador para análises intra-específicas. A utilização desse marcador como ferramenta molecular irá contribuir de forma determinante para o desenvolvimento de sistemas mais adequados para a manutenção da diversidade das comunidades de peixes além de acelerar e aumentar a exatidão das decisões tomadas para a conservação e manejo de estoques de pisciculturas e sistemas de procriação das espécies em questão.

## Abstract

In the last decades, many rivers have been dammed for the construction of reservoirs. Dams cause significant adverse impact on the population of local fish. Besides the flood regime changes and blocking of migratory routes of migratory fishes, one of the consequences of the construction of dams is the isolation of native populations, which can lead to effects such as the loss of genetic variability and endogamic depression. This can reduce the fitness and increase the risk of local extinction of the species. Thus, it is of huge relevance the accomplishment of populational studies in species which habitat has been fragmented as a result of dam building. Because of their high level of polymorphism, molecular markers have been largely used in populational analysis of many species of fish, in order to evaluate the genetic structure and variability of populations and the impact of the dams and the hatchery fish have on wild populations. The objective of this study was to characterize the genetic diversity and population structure of three fish species of the genus *Prochilodus* (*P. costatus*, *P. argenteus* e *P. lineatus*) in three River Basins of the state of Minas Gerais: Pará, Paraopeba e Grande which in recent decades have been changed by the construction of several dams. From 71 clones previously isolated by our group from a genomic library of *Prochilodus lineatus*, 8 were selected and the best PCR conditions achieved. In addition, the complex hypervariable repeat 2V35 was tested in 252 individuals of *Prochilodus* spp collected in the three Basins mentioned above. Its usefulness in population genetic studies was evaluated by analyzing indices of molecular diversity, molecular variance (AMOVA), isolation by distance besides filogenetics analyses. Only one haplotype was shared by the three species (Hap 1) proving the high level of discrimination by the marker for intra-specific analyzes. Fish from the three rivers showed high levels of gene diversity and significant differentiation was detected, suggesting that populations from the three sites were affected by the fragmentation of the River and the hatchery activity. Our study showed to be very helpful for the management and fish conservation in these areas.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização dos principais reservatórios para a geração de energia hidroelétrica no Brasil (reservatórios com altura da barragem maior que 15 m), podendo-se observar uma maior concentração na região sudeste. Fonte: Tundisi 2008. ....	22
Figura 2: Hidrografia regional da bacia do rio Paraopeba. A malha hidrográfica está representada em preto. Escala em quilômetros. ....	24
Figura 3: Hidrografia regional da bacia do rio Pará. A malha hidrográfica está representada em azul escuro. Escala em quilômetros. Fonte: Comitê da bacia Hidrográfica do rio Pará. ....	27
Figura 4: Hidrografia regional do rio Pará mostrando suas duas Usinas Hidrelétricas: Gafanhoto e Cajuru. A malha hidrográfica está representada em cinza. Escala em metros. ....	28
Figura 5: Vista aérea da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, pertencente à CODEVASF. Fonte: CODEVASF. ....	29
Figura 6: Mapa da bacia do rio Grande indicando suas respectivas Usinas Hidrelétricas. A malha hidrográfica está representada em azul claro. Escala em quilômetros. Fonte: Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande (Paiva <i>et al.</i> 2002). ....	31
Figura 7: Perfil vertical do rio Grande com suas 13 Usinas Hidrelétricas. Fonte: Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande (Paiva <i>et al.</i> 2002). ....	32
Figura 8: Migração – migração ascendente de curimbas no rio Itapeçerica, área metropolitana de Divinópolis, MG, durante a piracema de 2006/2007. Foto: Tiago Cerasim Pessali. ....	37
Figura 9: Sistema de Tranposição de peixes - escada de peixes da Usina de Igarapé, rio Paraopeba, MG. Foto: Carlos Bernardo Mascarenhas. ....	42
Figura 10: Sistema de Tranposição de peixes - vista parcial da escada de peixes da barragem de Igarapava, rio Grande, MG, mostrando no canto inferior direito o local por onde os peixes entram. Foto: Luiz Gustavo Martins da Silva. ....	42
Figura 11: Repovoamento - liberação de alevinos na UHE Volta Grande, rio Grande, MG. Fonte: CEMIG. ....	43
Figura 12: Repovoamento - liberação de alevinos na UHE Volta Grande, rio Grande, MG. Fonte: CEMIG. ....	43
Figura 13: Indivíduo adulto de <i>P. lineatus</i> . Foto: Alessandra Gomes Bedore. ....	47
Figura 14: Indivíduo adulto de <i>P. costatus</i> . Foto: Carlos B. M. Alves. ....	47
Figura 15: Indivíduo adulto de <i>P. argenteus</i> . Foto: Carlos B. M. alves. ....	47

Figura 16: Coleta de Matrizes de <i>P. lineatus</i> : jusante da UHE Porto Colombia, rio Grande, MG. Foto: Tatiana Moura Barroca. ....	59
Figura 17: Estação Ambiental de Volta Grande, localizada em Conceição das Alagoas, no Triângulo Mineiro. É a principal estação de piscicultura da CEMIG, responsável pela produção de alevinos de espécies das Bacias do rio Grande e Paranaíba. Possui tanques para a manutenção de reprodutores e alevinos, laboratórios e técnicos dedicados à reprodução. Foto: Tatiana Moura Barroca. ....	59
Figura 18: Coleta de exemplares de <i>P. lineatus</i> : montante da UHE Volta Grande, rio Grande, MG. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Alessandra Gomes Bedore. ....	60
Figura 19: Transferência das matrizes de <i>P. lineatus</i> capturadas a jusante da UHE Porto Colômbia, rio Grande, MG para o carro de transporte da CEMIG que promove o deslocamento até a Estação Ambiental de Volta Grande, MG. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Tatiana Moura Barroca. ....	60
Figura 20: Armazenamento dos peixes em tanques rede instalados nas margens do reservatório de Porto Colômbia, rio Grande, MG. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Tatiana Moura Barroca. ....	60
Figura 21: Mapa do vetor pUC 18, evidenciando o gene de resistência à ampicilina (bla (Apr)) .....	62
Figura 22: Banco de amostras de DNA de peixes do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares/ UFMG. Todas as 3.795 amostras de nadadeiras e fígado de 9 espécies de peixes ( <i>Prochilodus costatus</i> , <i>P. argenteus</i> , <i>P. lineatus</i> , <i>Leporinus elongotus</i> , <i>L. friderici</i> , <i>Brycon orbignyanos</i> , <i>Piractus mesopotamicus</i> , <i>Salminus maxlosus</i> , <i>S. franciscanus</i> ) provenientes das Bacias dos rios São Francisco e Paraná já estão catalogadas e armazenadas em suas gavetas assim como seu DNA extraído. ....	66
Figura 23: Mapa do vetor pCR 2.1 Topo evidenciando o sítio múltiplo de clonagem dentro do gene repórter lacZ e os genes que conferem resistência aos antibióticos ampicilina e kanamicina. ....	68
Figura 24: Marcadores moleculares encontrados no seqüenciamento de clones do peixe <i>P. lineatus</i> cujas seqüências flanqueadoras foram selecionadas para desenho dos iniciadores internos e externos a serem utilizados em <i>Nested</i> PCR. Todas as seqüências apresentadas estão no sentido 5'-3'. As regiões dos marcadores moleculares estão grifadas. A) Clone 2M3, B) Clone 2T21, C) Clone 2v35, D) Clone 2X7, E) Clone 2W20, F) Clone 2W31, G) Clone 2W34, H) Clone 3C10. ....	73
Figura 25: As matrizes que manifestavam sinais de maturação sexual externo, como fêmeas com abaulamento ventral com maciez foram selecionadas para reprodução. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Alessandra Gomes Bedore. ....	76
Figura 26: Verificação de maturação sexual de matrizes de <i>P. lineatus</i> na Estação Ambiental de Volta Grande, MG, através de canulação com retirada de sêmen.	

Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Evanguedes Kalapothakis.....	76
Figura 27: Aplicação da primeira dosagem hormonal (extrato bruto de hipófise de carpa) em Matriz de <i>P. lineatus</i> , no laboratório da Estação Ambiental de Volta Grande, MG. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Evanguedes Kalapothakis.....	77
Figura 28: Introdução do microchip na musculatura dorsal direita de uma Matriz de <i>P. lineatus</i> , próximo a base da nadadeira dorsal. Foi realizada para todos os indivíduos a correlação da marca recebida na seleção (lã colorida) com o número identificador do microchip, além do número do próprio aquário ao qual se destinou o reprodutor. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Evanguedes Kalapothakis.....	77
Figura 29: Retirada de amostra de tecido do lóbulo superior da nadadeira caudal de uma Matriz de <i>P. lineatus</i> para estocagem em etanol 70% e posterior catalogação no banco de dados do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares e extração de DNA. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Evanguedes Kalapothakis.....	78
Figura 30: Gel de agarose 2% contendo o produto de amplificação da segunda etapa da <i>Nested</i> PCR, utilizando-se o tampão IV B. Canaleta 1: padrão de peso molecular 1 KB (Amresco). A seta indica o tamanho de 500 pb. Canaletas 2 a 12: produtos da <i>Nested</i> PCR das amostras referentes às matrizes da EAVG 110, 124, 129, 130, 132, 136, 139, 144, 161, 172 e 197. Canaleta 13: controle positivo da reação. Canaleta14: controle negativo da reação.....	79
Figura 31: Placa de Petri contendo meio de cultura LB-Agar com ampicilina mostrando a alta eficiência da subclonagem do exemplar de <i>P. costatus</i> PcR40, coletado no rio Paraopeba, MG. As colônias brancas possuem o plasmídeo pCR 2.1 TOPO, resistente à ampicilina.....	80
Figura 32: PCR de colônia antes da purificação com RNase do exemplar de <i>P. costatus</i> PcR40, coletado no rio Paraopeba, MG, em gel de agarose 1,5% para verificação de inserto de DNA exógeno no vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO. Canaleta 1: padrão de peso molecular 1.200pb. A seta indica o tamanho de 500 pb. Canaletas 2 a 15: produto de PCR de colônia do exemplar PcR40. ....	80
Figura 33: Exemplo de quatro eletroferogramas resultantes do seqüenciamento da região do marcador molecular 2V35 após subclonagem, do exemplar PcR40 de <i>P. costatus</i> coletado no rio Paraopeba, MG, mostrando alta qualidade dos picos.....	81
Figura 34: Resolução eletroforética da reação de <i>Nested</i> PCR em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, para amplificação de 14 amostras de <i>P. costatus</i> coletadas no rio Paraopeba, MG. Canaleta 1: Marcador de Peso Molecular 1KB (Amresco). Canaletas 2 a 15: amostras de <i>P. costatus</i> amplificadas. Canaleta 16: controle positivo da reação. ....	83

Figura 35: Cálculo do isolamento por distância para <i>P. costatus</i> coletados no rio Paraopeba ( $r = 0.115$ , $P < 0.001$ ) utilizando-se o programa <i>Alleles in Space</i> (Miller 2005). .....	88
Figura 36: Cálculo do isolamento por distância para <i>P. argenteus</i> coletados no rio Paraopeba ( $r = 0.649$ , $P < 0.001$ ) utilizando-se o programa <i>Alleles in Space</i> (Miller 2005). .....	88
Figura 37: Cálculo do isolamento por distância para <i>P. costatus</i> coletados no rio Pará ( $r = 0.196$ , $P < 0.001$ ) utilizando-se o programa <i>Alleles in Space</i> (Miller 2005). .....	93
Figura 38: Árvore filogenética da espécie <i>P. costatus</i> coletada no rio Pará, construída utilizando-se o algoritmo NJ com base em 25 haplótipos do marcador molecular 2V35. Os números próximos aos ramos indicam <i>bootstrap</i> de 10.000 repetições. Três <i>clusters</i> são evidentes. ....	94
Figura 39: Árvore filogenética das matrizes reprodutoras da espécie <i>P. costatus</i> coletada no rio Grande, construída utilizando-se o algoritmo NJ com base em 36 haplótipos do marcador molecular 2V35. Os números próximos aos ramos indicam <i>bootstrap</i> de 10.000 repetições. Dois <i>clusters</i> são evidentes. ....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sítios de coleta, número de amostras, e coordenadas geográficas das amostras de <i>Prochilodus costatus</i> e <i>Prochilodus argenteus</i> na bacia do rio Paraopeba. Todos os peixes foram coletados no período de 2008 a 2009. ....	57
Tabela 2. Sítios de coleta e coordenadas geográficas das amostras de <i>Prochilodus costatus</i> e <i>Prochilodus argenteus</i> na bacia do rio Pará. Todos os peixes foram coletados no período de 2006 a 2007. ....	57
Tabela 3: Clones de <i>Prochilodus</i> spp. Isolados a partir da biblioteca genômica do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares - UFMG. Primeira coluna: clones utilizados para eletrotransformação, segunda coluna: identificação do clone, terceira coluna: indicação do número de seqüenciamentos realizados por clone.....	71
Tabela 4. Substituições e indels encontrados nos 35 haplótipos do marcador 2V35 para <i>P. costatus</i> coletados no rio Paraopeba.....	84
Tabela 5. Substituições e indels encontrados nos 22 haplótipos do marcador 2V35 para <i>P. argenteus</i> coletados no rio Paraopeba. ....	85
Tabela 6. Índices de diversidade molecular de <i>P. costatus</i> e <i>P. argenteus</i> observados para os cinco sítios de coleta no rio Paraopeba sugerindo uma combinação de polimorfismos que dão origem aos haplótipos. ....	86
Tabela 7. Diferenciação populacional de <i>P. costatus</i> e <i>P. argenteus</i> no rio Paraopeba e suas lagoas marginais. ....	87
Tabela 8. Valores do $F_{st}$ par a par entre os cinco sítios amostrados para todos os indivíduos de <i>P. costatus</i> coletados no rio Paraopeba. ....	87
Tabela 9. Valores do $F_{st}$ par a par entre os cinco sítios amostrados para todos os indivíduos de <i>P. argenteus</i> coletados no rio Paraopeba. ....	87
Tabela 10. Substituições e indels encontrados nos 35 haplótipos do marcador 2V35 para <i>P. costatus</i> coletados no rio Pará.....	90
Tabela 11. Índices de diversidade molecular de <i>P. costatus</i> observados para os três sítios de coleta do rio Pará sugerindo uma combinação de polimorfismos que dão origem aos haplótipos.....	92
Tabela 12. Diferenciação populacional de <i>P. costatus</i> no rio Pará.....	92
Tabela 13. Valores do $F_{st}$ par a par entre os cinco sítios amostrados para todos os indivíduos de <i>P. costatus</i> coletados no rio Pará.....	92
Tabela 14. Substituições e indels encontrados nos 35 haplótipos do marcador 2V35 para <i>P. lineatus</i> coletados no rio Grande. ....	96
Tabela 15. Índices de diversidade molecular das matrizes reprodutoras de <i>P. costatus</i> da EAVG coletadas a jusante da UHE Porto Colombia, rio Grande sugerindo uma combinação de polimorfismos que dão origem aos haplótipos.....	99

Tabela 16. Índices de diversidade molecular observados para <i>Prochilodus</i> spp. sugerindo uma combinação de polimorfismos que dão origem aos haplótipos. ....	101
Tabela 17. Diferenciação populacional de <i>Prochilodus</i> spp. nos rios Paraopeba, Pará e Grande.....	102
Tabela 18. Valores do $F_{st}$ par a par entre os quatro sítios amostrados para todos os indivíduos de <i>Prochilodus</i> spp. ....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AFLP** – *Amplified Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados

**AMOVA** – *Analysis of Molecular Variance*, Análise de Variância Molecular

**BH** – Belo Horizonte

**CBH - PARÁ** – Comitê da Bacia Hidrográfica do rio Pará

**CEMIG** – Companhia Energética de Minas Gerais

**CODEVASF** – Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba

**COPAM** - Conselho Estadual de Política Ambiental

**DNA** – Ácido Desoxirribonucléico

**DNTP** – Desoxinucleotídeo Tri-fosfato

**EAVG** – Estação Ambiental de Volta Grande

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EIA** - Estudo de Impacto Ambiental

**EUA** – Estados Unidos da América

**F** – Índice de Fixação

**F1** - Primeira geração

**FAO/DVWK** – *Food and Agriculture Organization/German Association for Water Management and Improvement*, Organização para a Alimentação e Agricultura/ Associação Alemã para Gestão da Água

**F<sub>ST</sub>** – Índice de Fixação

**g** – Gravidade

**gl** – Grau de Liberdade

**H** – Diversidade Gênica

**H** - Heterozigosidade

**HCl** – Ácido Clorídrico

**HPL** – *Highly Polymorphic Locus*, Locus Hipervariável

**INDEL** – Inserção/Deleção

**Kb** – Kilobases

**Kg** - Kilograma

**Km** – Kilometros

**kVa** – Quilovolt-amperes

**LB** – Luria-Bertani

**MG** – Minas Gerais

**mg** – Miligrama

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de Magnésio

**MgSO<sub>4</sub>** – Sulfato de Magnésio

**min** – Minutos

**mL** – Mililitros

**mM** – Milimolar

**mtDNA** - DNA mitocondrial

**NaCl** – Cloreto de Sódio

**NaOH** – Hidróxido de Sódio

**NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*, Centro Nacional para Informação em Biotecnologia

**pb** – Pares de Bases

**PCH** - Pequena Central Hidrelétrica

**PCR** – *Polymerase chain reaction*. Reação em cadeia da polimerase

**pH** – Potencial Hidrogeniônico



**pmol** – picomol

**RAPD**– *Random amplification of polymorphic DNA*, amplificação aleatória de DNA polimórfico

**RIMA** - Relatório de Impacto Ambiental

**RFLP**– *Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

**S** - Sul

**SNP** - *Single Nucleotide Polimorphism*

**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio

**STP** – Sistema de Transposição de Peixes

**seg** – Segundos

**SUDEPE** - Superintendência do Desenvolvimento da Pesca

**T<sub>m</sub>** – Temperatura Média

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

**UHE** – Usina Hidrelétrica

**W** - Oeste

**°C** – Graus Celsius

**µg** – Micrograma

**µL** – Microlitros

**π** – Diversidade Nucleotídica

**%** – Porcento

## SUMÁRIO

1) Introdução:.....	20
1.1) Visão geral do projeto: .....	21
1.2) O rio Paraopeba:.....	22
1.3) O rio Pará:.....	25
1.4) O rio Grande: .....	29
1.5) As hidrelétricas e o impacto nas populações de peixes:.....	33
1.6) Sistemas de Transposição de Peixes.....	37
1.7) Repovoamento.....	39
1.8) Manejo de recursos pesqueiros em UHEs no Brasil.....	44
1.9) O gênero <i>Prochilodus</i> .....	45
1.10) Marcadores Moleculares .....	49
1.11) Efeitos genéticos nas populações de curimbas dos rios Paraopeba, Pará e Grande: .....	53
2) Objetivos:.....	55
2.1) Objetivo Geral: .....	55
2.2) Objetivos Específicos: .....	55
3) Metodologia: .....	56
3.1) Material coletado.....	56
3.1.1) rio Paraopeba .....	56
3.1.2) rio Pará.....	57
3.1.3) rio Grande.....	57
3.2) Biblioteca genômica: .....	61
3.3) Isolamento de marcadores moleculares para <i>Prochilodus</i> spp.....	61
3.4) Estudo genético das matrizes da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG), Minas Gerais: reprodução induzida e marcação com microchip .....	64
3.5) Extração de DNA Genômico e organização do banco de DNA de peixes do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares - UFMG:.....	65
3.6) Amplificação e análise do <i>locus</i> 2V35: .....	66

3.7) Subclonagem do produto de <i>Nested</i> PCR em plasmídeo PCR 2.1 TOPO <i>Invitrogen</i> : .....	67
3.8) Transformação dos plasmídeos PCR 2.1 TOPO ( <i>Invitrogen</i> ) em bactérias <i>Escherichia coli</i> eletrocompetentes: .....	68
3.9) Extração dos plasmídeos PCR 2.1 TOPO ( <i>Invitrogen</i> ) por lise alcalina:.....	68
3.10) Análise de seqüenciamento: .....	69
3.11) Análise estatística dos dados: .....	69
4) Resultados.....	70
4.1) Seqüenciamento e análise de clones positivos: .....	70
4.2) Estudo genético das matrizes da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG), Minas Gerais: reprodução induzida e marcação com microchip .....	74
4.3) Amplificação e análise do <i>locus</i> 2V35: .....	78
4.4) Subclonagem do produto da <i>Nested</i> PCR em plasmídeo pCR 2.1 TOPO <i>Invitrogen</i> : .....	79
4.5) Análise dos seqüenciamentos automáticos de DNA:.....	81
4.6) Análise estatística dos dados: .....	82
4.6.1) Amostras do rio Paraopeba: .....	82
4.6.1.1) Índices de diversidade:.....	82
4.6.1.2) Diferenciação e estrutura populacional:.....	86
4.6.1.3) Isolamento por distância:.....	87
4.6.2) Amostras do rio Pará: .....	89
4.6.2.1) Índices de diversidade:.....	89
4.6.2.2) Diferenciação e estrutura populacional:.....	92
4.6.2.3) Isolamento por distância:.....	93
4.6.2.4) Análise filogenética: .....	93
4.6.3) Amostras do rio Grande:.....	94
4.6.3.1) Índices de diversidade:.....	94
4.6.3.2) Análise filogenética: .....	99
4.6.4) Amostras de <i>Prochilodus</i> spp. dos rios Paraopeba, Pará e Grande:.....	101
4.6.4.1) Índices de diversidade:.....	101

4.6.4.2) Diferenciação e estrutura populacional:.....	101
5) Discussão .....	102
5.1) Marcadores Moleculares .....	102
5.2) Biblioteca genômica e seqüenciamento .....	104
5.3) Desenho e teste de iniciadores para PCR.....	105
5.4) Análises populacionais.....	106
5.5) rio Paraopeba.....	107
5.6) rio Pará .....	108
5.7) rio Grande .....	110
5.8) Amostras de <i>Prochilodus</i> spp. dos rios Paraopeba, Pará e Grande: a eficiência do marcador 2V35.....	111
6) Conclusões:.....	113
7) Perspectivas: .....	114
Referências Bibliográficas:.....	115
Anexos.....	133
Anexo 1: Exemplo da Tabela de controle das matrizes de <i>P. lineatus</i> referente à reprodução da segunda semana de novembro de 2010.....	134
Anexo 2: Artigos Produzidos .....	135

## 1) INTRODUÇÃO:

### 1.1) Visão geral do projeto:

A região sudeste do Brasil apresentou um forte crescimento industrial nas últimas décadas. Para suprir a demanda energética decorrente desse crescimento, foram construídas diversas usinas hidrelétricas (Figura 1), cujas barragens impendem o fluxo natural das águas dos rios. A construção de um reservatório gera diversos impactos sobre a fauna e a flora, dentre eles, mudanças na fauna de peixes (Tundisi 1987, Tundisi 2008).

A diminuição da abundância de certas espécies de peixes ou mesmo a extinção de algumas delas têm ressaltado a importância e a necessidade de programas de conservação ambiental, principalmente, diante de impactos diretamente promovidos pelas atividades antrópicas, como a própria construção de hidrelétricas. Mas, sobretudo, tais programas de conservação devem garantir que as medidas adotadas sejam realmente efetivas verificando, para isso, a manutenção da biodiversidade local.

O sucesso nos programas de manejo dos recursos pesqueiros não depende apenas de ações isoladas. Muitas técnicas de gerenciamento foram empregadas para reduzir problemas ambientais (Ludwig *et al.* 1993). A falta de informação sobre os sistemas que estão sendo manejados e a ausência ou inadequação das técnicas de monitoramento, são em geral os principais problemas que afetam a eficiência do gerenciamento (Agostinho & Gomes 1997). A instalação de sistemas de transposição de peixes (STPs) e o repovoamento não fogem desta regra. Para que estes sejam eficientes é necessário que uma série de estudos seja realizada e algumas premissas sejam atendidas.

Nesta introdução, iremos abordar os seguintes temas: os rios Paraopeba, Pará, Grande e suas características; as usinas hidrelétricas (UHEs) e o impacto nas populações de peixes; os sistemas de transposição de peixes; o repovoamento; o manejo de recursos pesqueiros em UHEs no Brasil; o gênero *Prochilodus*; os marcadores moleculares e por fim, os efeitos genéticos causados pelos barramentos dos rios nas populações das três espécies de peixes migratórios estudadas neste trabalho: *P. costatus*, *P. argenteus* e *P. lineatus*.

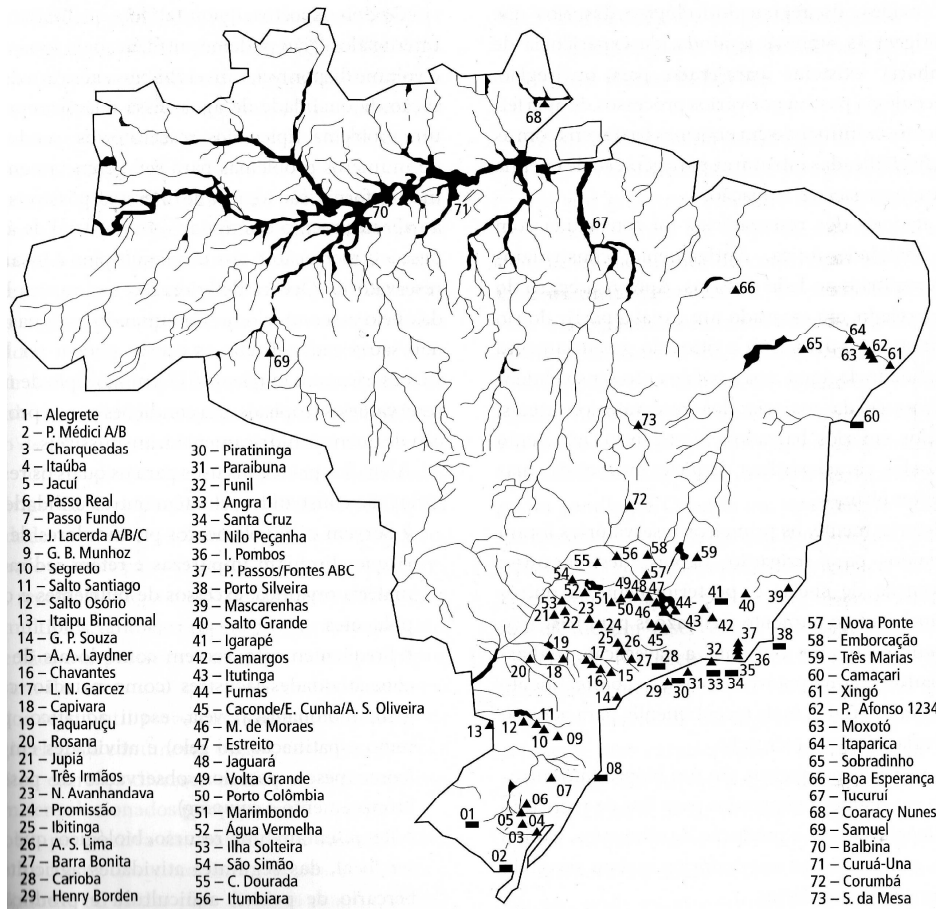


Figura 1: Localização dos principais reservatórios para a geração de energia hidroelétrica no Brasil (reservatórios com altura da barragem maior que 15 m), podendo-se observar uma maior concentração na região sudeste. Fonte: Tundisi 2008.

## 1.2) O rio Paraopeba:

A bacia hidrográfica do rio Paraopeba situa-se na área central do estado de Minas Gerais, possuindo uma área de cerca de 13.300 Km<sup>2</sup> (2,5% da área total do estado), compreendendo quarenta e oito municípios, com uma população de aproximadamente 933.000 habitantes. A população total concentra-se em 14 dos 48 municípios da bacia, localizando-se principalmente nas regiões do alto curso e parte superior do baixo curso do rio Paraopeba (Schvartzman 2002).

Nas últimas décadas do século XVII, a bacia do Paraopeba começou a ser ocupada devido à procura de riquezas minerais. Com o passar do tempo, a principal atividade na região era a mineração. As atividades pecuárias deram início na região com a utilização dos rios São Francisco e Paraopeba como rotas de transporte e comércio.

O rio Paraopeba nasce ao sul do município de Cristiano Ottoni e possui cerca de 510 Km de extensão até sua foz no município de Felixlândia, Minas Gerais (CETEC 1983, Schwartzman 2002).

O rio Paraopeba possui duas represas mais antigas na sua porção superior: a Usina Termoelétrica de Igarapé e a Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Salto do Paraopeba (Alves 2007) e uma terceira construída recentemente na sua porção mais baixa: Usina Hidrelétrica (UHE) de Retiro Baixo (Figura 2).

A maioria das espécies de peixes endêmicas do rio São Francisco (51%) está presente também no rio Paraopeba. Entretanto, no rio Paraopeba, estas espécies estão constantemente ameaçadas por atividades humanas, como mineração, descarga de efluentes industriais e esgoto doméstico, pesca predatória, destruição de matas de galeria, e drenagem de zonas úmidas em apoio ao desenvolvimento agrícola (Drummond *et al.* 2005).

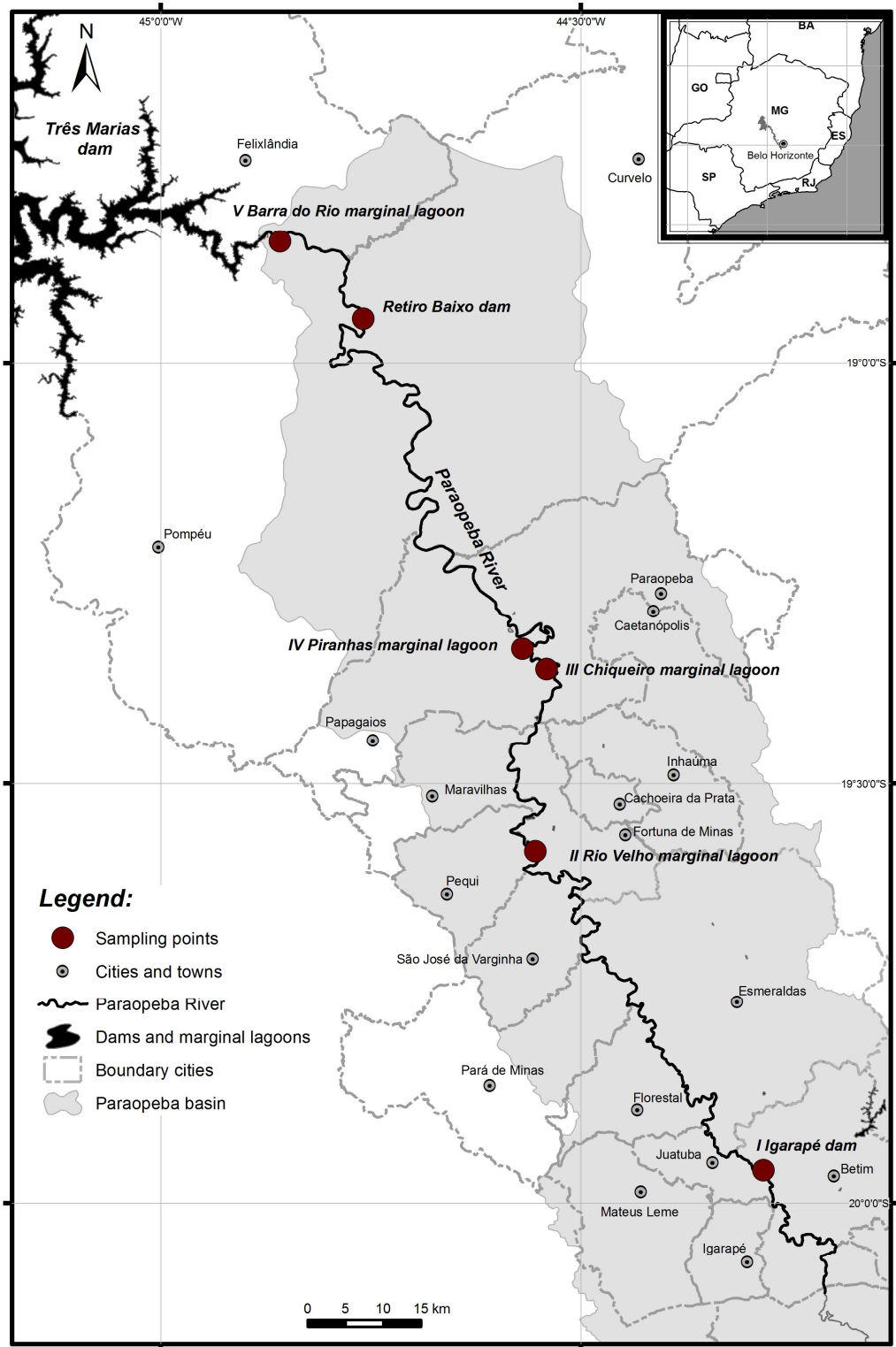


Figura 2: Hidrografia regional da bacia do rio Paraopeba. A malha hidrográfica está representada em preto. Escala em quilômetros.



### 1.3) O rio Pará:

A bacia hidrográfica do rio Pará (Figura 3) está situada no estado de Minas Gerais e compreende uma área de aproximadamente 12.500 km<sup>2</sup>. Ela alonga-se na direção norte-sul, tendo sua origem na região serrana de Entre rios, Piracema e Desterro de Entre rios e tendo sua foz no rio São Francisco, à montante do reservatório de Três Marias, no município de Pompeu (Pellegrin 2001). É uma das bacias mais importantes do sistema do rio São Francisco, abrangendo 38 municípios nos quais vivem cerca de 650 mil habitantes.

Os rios Pará, Paraopeba e das Velhas são alguns dos principais afluentes do alto São Francisco (Alves 1995). O rio Pará nasce no município de Resende Costa e compreende uma área de drenagem de 12.262 km<sup>2</sup>, atingindo uma extensão de 310,6 km. Seus principais afluentes são: Peixe, Itapecerica, São João, Lambari e do Picão. O rio Pará drena o maior centro urbano da bacia é Divinópolis, com mais de 200 mil habitantes, cujos efluentes domésticos e industriais lançados *in natura* no rio podem funcionar como uma barreira para a dispersão dos peixes (Salvador 2011).

Em seu curso estão instaladas duas Usinas Hidrelétricas (Figura 4). A UHE Gafanhoto localizada no município de Divinópolis (Minas Gerais), cuja operação iniciou-se em 1946, sendo a usina mais antiga da CEMIG (Companhia Energética de Minas Gerais) e a UHE Cajurú, localizada nos municípios de Divinópolis, Carmo do Cajurú e Cláudio (Minas Gerais), cuja operação iniciou-se em 1959 (Portal Peixe Vivo. rios de Minas. Disponível *online* em: <<http://www.portalpeixevivo.com.br>>, acesso: Janeiro de 2009).

Devido ao impacto ambiental causado por essas duas barragens, o rio Pará, desde 1983, tem sido alvo de programas de repovoamento realizados pela Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, sendo *Prochilodus costatus*, uma das espécies de peixes utilizados como medidas de mitigação para os impactos sofridos.

Criada em 1974, a CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba) é uma empresa pública, vinculada ao Ministério da Integração Nacional, que promove o desenvolvimento e a revitalização das bacias dos rios São Francisco e Parnaíba com a utilização sustentável dos recursos naturais e estruturação de atividades produtivas para a inclusão econômica e social. Com a Lei Nº 12.196, sancionada em 14 de janeiro de 2010, a empresa passou a atuar também nas Bacias dos rios Itapecuru e Mearim, no estado do Maranhão. Além de executar monitoramento ambiental e projetos de revitalização de bacias hidrográficas, a CODEVASF também investe na aplicação de novas tecnologias, diversificação de culturas, recuperação de áreas ecologicamente degradadas, capacitação e

treinamento de produtores rurais, além da realização de pesquisas e estudos socioeconômicos e ambientais. Disponível em: <<http://www.codevasf.gov.br>> (Acesso em: Abril de 2012).

A Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias (Figura 5), pertencente à CODEVASF, foi implantada em 1980, e localiza-se no Município de Três Marias, a jusante da barragem de Três Marias, atuando na região do Alto São Francisco, no Estado de Minas Gerais. A estação tem como principais atividades a execução de pesquisas em limnologia (estudos físicos, químicos e biológicos da água) e ictiologia (estudos biológicos dos peixes); desenvolvimento de tecnologias de reprodução artificial, larvicultura e alevinagem de peixes nativos na bacia do rio São Francisco; realização de peixamentos na região do alto São Francisco com alevinos de espécies nativas, e a promoção de treinamentos a estudantes e graduados em biologia, medicina veterinária, engenharia de pesca, oceanografia, agronomia e zootecnia.

Quanto ao desenvolvimento de tecnologias, a estação possui o domínio da reprodução artificial de 32 espécies de peixes, ou seja, cerca de 20% do total das espécies nativas do rio São Francisco.

Hoje a estação trabalha com as seguintes espécies de peixes: *Prochilodus argenteus* (Curimatá-pacu), *Prochilodus costatus* (curimatá-pioa), *Pseudoplatystoma corruscans* (Surubim), *Salminus franciscanus* (Dourado), *Leporinus obtusidens* (Piau Verdadeiro), *Brycon orthotaenia* (Matrinchã), *Lophiosilurus alexandri* (Pacamã), *Conorhynchos conirostris* (Pirá).



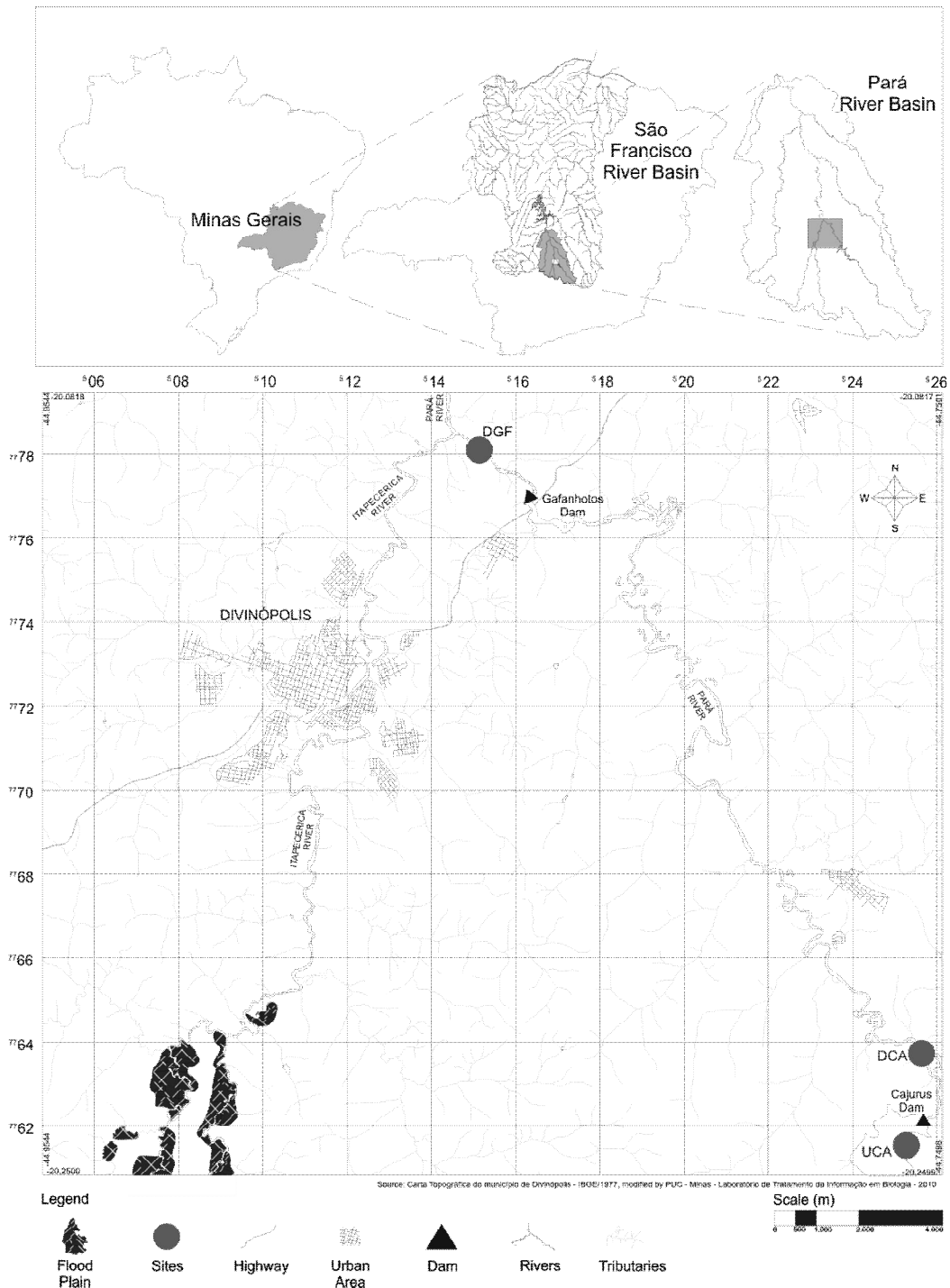


Figura 4: Hidrografia regional do rio Pará mostrando suas duas Usinas Hidrelétricas: Gafanhoto e Cajú. A malha hidrográfica está representada em cinza. Escala em metros. Onde o sítio I localiza-se a jusante da barragem de Gafanhoto (DGF), o sítio II, entre as barragens de Gafanhoto e Cajú (DCA) e o sítio III no reservatório de Cajú (UCA).



Figura 5: Vista aérea da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, pertencente à CODEVASF. Fonte: CODEVASF.

#### 1.4) O rio Grande:

A bacia hidrográfica do rio Grande (Figura 6) pertence à bacia do rio Paraná, uma das maiores do Brasil, que ocupa cerca de 10% do território nacional (891.309 km<sup>2</sup>), drenando áreas da região sul, sudeste e centro-oeste, constituindo, juntamente com a bacia do rio Paraguai e do rio Uruguai, a grande bacia do rio Prata. A bacia do rio Grande ocupa uma área de cerca de 161.000 km<sup>2</sup>, sendo que 60%, aproximadamente 86.500 Km<sup>2</sup>, pertencem ao estado de Minas Gerais e o restante, ao estado de São Paulo (Paiva *et al.* 2002). Nesta bacia é gerada cerca de 67% de toda energia elétrica do estado de Minas Gerais.

As águas do rio Grande nascem em Minas Gerais, a uma altitude de 1.239 m na serra da Mantiqueira, próximo aos municípios de Alagoa e Bocaina de Minas. Desde sua cabeceira até sua foz, o rio Grande percorre uma distância de 1.301 km. Seus principais tributários são: rio das Mortes, Jacaré, Uberaba e Verde à margem direita; e rio Aiuruoca, Cervo, Sapucaí, Sapucaí-Mirim, Pardo e Turvo à margem esquerda. Em seu trecho alto, na região do sudeste mineiro o rio corre para o norte, sua calha é estreita, predominantemente encaixada, sinuosa e com sucessivas cachoeiras e corredeiras (Paiva *et al.* 2002).

A partir do município de Santana do Garambéu, MG, começa-se uma sucessão de barragens de Usinas Hidroelétricas (UHEs), que hoje proporcionam ao rio Grande uma nova fisionomia. O rio possui treze usinas hidrelétricas instaladas em seu curso

(Figura 7). A primeira barragem construída no rio Grande foi uma pequena usina em um braço da cachoeira do Marimbondo em 1929. A UHE de Furnas foi implementada no final dos anos 50, criada como forma de evitar uma crise energética no país e desde então, começaram as implantações de UHEs de grande porte ao longo do rio.

A presença maciça de Usinas Hidrelétricas nesse rio alterou suas características originais de corredeiras caudalosas para um ambiente quase lântico, transformando a maior parte do rio em uma série de lagos artificiais e como consequência houveram modificações na composição e na abundância da fauna nativa de peixes (Godinho & Godinho 1994).

A UHE Volta Grande, pertencente à Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), localiza-se no município de Conceição das Alagoas (Minas Gerais) e foi construída no período de 1970 a 1974, pela CEMIG. A Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG), criada em 1976 para atender à obrigatoriedade legal de repovoar os reservatórios de hidrelétricas com diferentes espécies de peixes, localiza-se à jusante da UHE Volta Grande às margens do rio Grande e conta atualmente com uma reserva florestal de cerca de 410 hectares, um viveiro de mudas que se destina à produção de espécies ciliares e urbanas e uma estação de piscicultura que possui cerca de 100 tanques. A empresa realiza parcerias com Universidades, como por exemplo a parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para o levantamento da ictiofauna do reservatório. Além disso, realiza também programas de educação ambiental e monitoramento, através de marcação, análises genéticas, comportamentos biológicos e, principalmente, migratórios dos peixes.

Abaixo da UHE Volta Grande, localiza-se a UHE Porto Colômbia, pertencente ao município de Planura (Minas Gerais), construída no período de 1970 a 1973. No alto da barragem da usina foi instalado um Posto Policial com vigilância constante, já que a pesca é proibida até 500 m de distância da barragem, para evitar pesca predatória, já que na época da piracema há uma aglomeração de peixes ao pé da barragem.



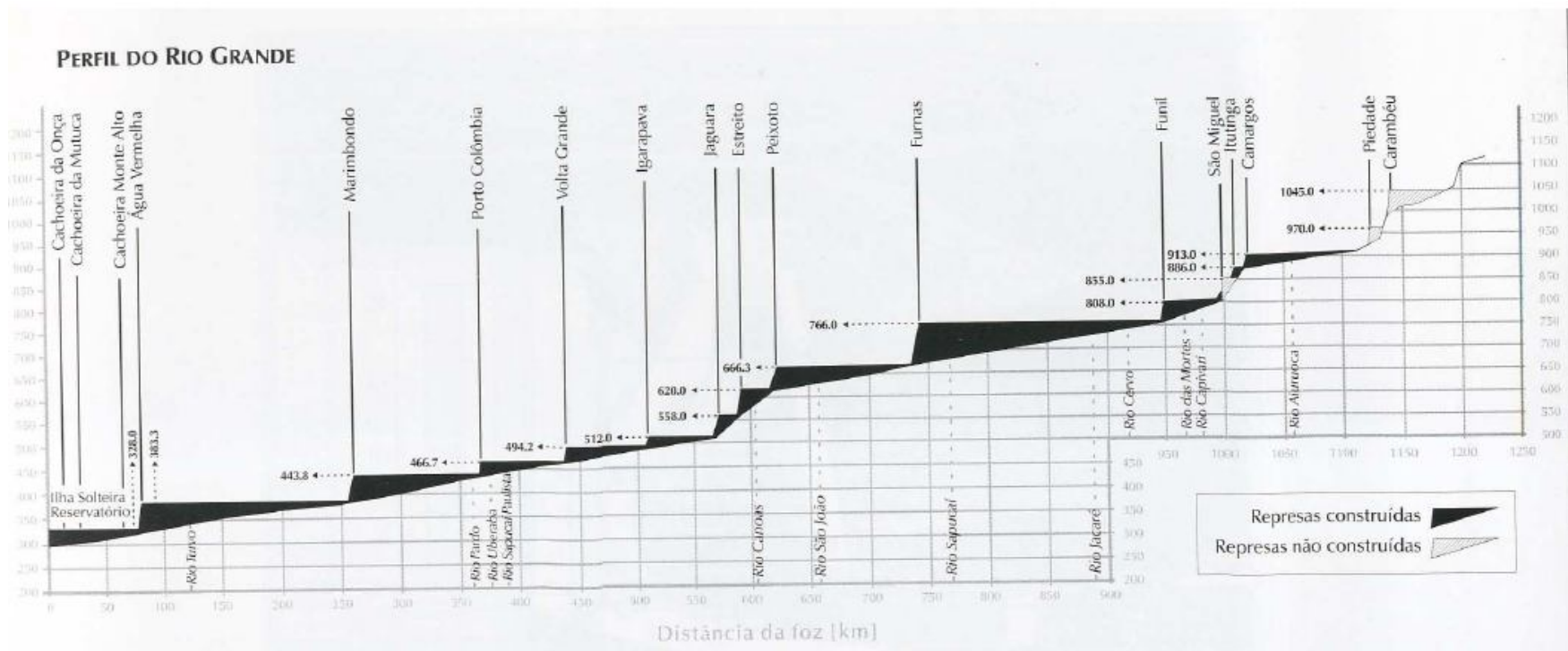


Figura 7: Perfil vertical do rio Grande com suas 13 Usinas Hidrelétricas. Fonte: Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande (Paiva et al. 2002).



### **1.5) As hidrelétricas e o impacto nas populações de peixes:**

De acordo com Junk *et al.* (1989), os rios e suas planícies de inundação são considerados um sistema inseparável. Neste sistema estão incluídos habitats lóticos, habitats permanentemente lênticos e a planície alagável; cada um possuindo propriedades únicas, caracterizando-se em um ecossistema específico. Dentre esses ambientes estão as lagoas marginais, que ocupam as depressões laterais do rio e apresentam comunicação constante ou intermitente com o mesmo. Durante as cheias, as lagoas formam áreas inundadas e canais que enriquecem o habitat, pois são abastecidas com nutrientes e materiais orgânicos vindos do rio. Essas lagoas podem ser consideradas berçários para muitas espécies de peixes migradores (Vazzoler *et al.* 1997, Agostinho *et al.* 1993, Medeiros & Maltchik 2001, Welcomme 1979).

Nas últimas décadas, muitos rios vêm sendo represados na região sudeste do Brasil para a construção de usinas hidrelétricas devido à crescente demanda de energia, consequência do aumento da população mundial e do desenvolvimento industrial.

O Brasil contém cerca de 15% de toda a água doce do planeta, sendo dotado de uma vasta e densa rede hidrográfica. Seus rios possuem um alto potencial para a geração de energia elétrica, já que são, em sua maioria, rios de planalto com grandes extensões, larguras e profundidades, além de possuírem em seu leito rupturas de declive e vales encaixados. O volume de geração de energia das Usinas Hidrelétricas excede as demais energias renováveis, como por exemplo, a aeólica, geotérmica ou a fotovoltaica. As Hidrelétricas são menos poluentes do que as Usinas Térmicas ou Nucleares, apesar de poderem gerar gases pela decomposição de matéria orgânica, contribuindo com o efeito estufa (Lopes & Bedore 2008). Cerca de 90% da energia consumida no país provém de Usinas Hidrelétricas e por esse motivo, muitos rios brasileiros têm sido transformados numa sucessão de barragens, provocando uma fragmentação de habitats, inundações de grandes áreas, alterações no regime hidrológico natural, na qualidade da água e na reprodução da ictiofauna local (Petts 1989, Martins & Tamada 2000).

Os grandes reservatórios são algumas das principais fontes de impacto sobre os recursos pesqueiros, podendo ser considerada a principal ameaça à conservação de peixes migradores de água doce. O barramento causa modificações no regime hidrológico, bloqueio de rotas migratórias de espécies de peixes, que necessitam de se deslocar à montante para desova no período reprodutivo, aprisionamento de nutrientes e diminuição da fertilidade de planícies (Lopes & Bedore 2008, Larinier 2000). De acordo com Tundisi (1987), alterações de um ambiente lótico (água

corrente) para um ambiente lântico (água parada) se dá gradualmente, levando à compartimentalização do reservatório em três principais regiões: a região lótica, a região de transição e a região lântica. Essa mudança ambiental pode ser dividida em duas fases: o enchimento e a colonização.

O período de enchimento de uma represa começa com o fechamento da mesma e seu término se dá com o início da operação normal do reservatório. Nos primeiros dias desse período, indivíduos de várias espécies de peixes ocupam todo o reservatório e toda a coluna d'água, independente do tipo de hábitat que ocupavam no rio ou que ocuparão no reservatório. Os peixes começam, então, a se dispersar em tributários do reservatório e também no rio principal à medida que ocorre um aumento das zonas anóxicas (regiões com pouco oxigênio devido ao aumento da concentração de nutrientes pela decomposição da matéria orgânica afogada). As espécies que permanecem no reservatório concentram-se próximas aos tributários e em zonas litorâneas (Agostinho *et al.* 1999).

De acordo com Agostinho *et al.* (1999), o período da colonização, que vem depois, se inicia com a operação normal do reservatório. Este período está diretamente ligado à composição de espécies da comunidade natural e da estação do ano na qual ocorreu o enchimento, pois esse fator interage com o período de migração e com o tempo de dispersão das espécies. De modo geral, observa-se uma tendência de maior diversidade de espécies de peixes na região riverina devido à conservação de características do ambiente lótico, e na região litorânea, devido a sua maior produtividade.

Os impactos observados a montante incluem o afogamento de quedas d'água, que leva à introdução de espécies nos segmentos a montante devido a eliminação das barreiras naturais e a ampliação das áreas lacustres da bacia, levando à proliferação de espécies sedentárias (Agostinho 1994), e a inibição da reprodução de espécies migradoras como *P. argenteus* e *P. costatus* (Arantes *et al.* 2010b).

Os impactos a jusante incluem o controle do nível da água para a finalidade da barragem (exemplo: geração de energia) muitas vezes causando alterações que são prejudiciais à ictiofauna local, interferindo nos abrigos, na alimentação e na desova (Martins 2000, Arantes *et al.* 2010a); a retenção de sedimentos no reservatório levando a um aumento da transparência da água, que pode aumentar a mortalidade de jovens por predação, e a uma redução de alimentos bentônicos (Agostinho 1994); a queda d'água do vertedouro pode apresentar supersaturação gasosa levando a mortandade de peixes por embolia (Agostinho 1994); reduções súbitas na vazão a jusante levam à exposição do leito do rio causando a mortandade de peixes por asfixia, mudança de temperatura da água ou dessecação (Agostinho 1994) e por

fim, em operações de manutenção das turbinas, há concentração de peixes sob condições de baixo oxigênio, o que os leva a morte (Martins 2000).

A redução nos estoques pesqueiros detectada em vários rios da América do Sul, é atribuída, entre outros fatores, a falhas no recrutamento devido ao bloqueio das rotas migratórias dos peixes (Pompeu *et al.* 2008). Geralmente observa-se que espécies sedentárias e de médio porte tornam-se dominantes em detrimento das espécies migradoras e de grande porte (Agostinho *et al.* 1999).

A migração desempenha um papel fundamental no sucesso reprodutivo de peixes migradores (Figura 8). Há uma grande variação nos padrões migratórios, dependendo do tipo (reprodutivo ou alimentar), direção (rio acima ou rio abaixo) e forma (passiva ou ativa) (Pavlov *et al.* 2002). As espécies de piracema têm como característica a segregação entre os nichos reprodutivos, alimentares e de crescimento (Northcote 1984).

De acordo com Moyle e Cech Jr. (1996) e Larinier (2001), espécies migradoras podem ser diádromas, anfídromas ou potamódromas.

O ciclo de vida de espécies diádromas, ocorre parte em água doce, parte em água salgada. Nessa categoria podem-se distinguir dois grupos: as espécies anádromas, como o salmão, em que a reprodução ocorre em águas doces e a fase de crescimento no mar; e as espécies catádromas, como a enguia, que possuem ciclo de vida contrário, ou seja, a reprodução ocorre no mar e o crescimento em águas doces.

As espécies anfídromas passam parte de seu ciclo de vida tanto em águas doces quanto em águas salgadas e as suas migrações ocorrem em busca de alimento e refúgio e não para fins de reprodução.

Nas espécies potamódromas, como as curimbas, todo o ciclo de vida ocorre em águas doces de sistemas fluviais. Os sítios de reprodução e alimentação podem estar separados por distâncias de até centenas de quilômetros.

As espécies mais afetadas pela construção de um reservatório são aquelas que dependem de longas migrações para se reproduzir, pois o barramento causa alterações na descarga e nas características físico-químicas dos rios podendo haver bloqueio ou atraso da migração ascendente, e portanto contribuir para o declínio ou mesmo a extinção de espécies que dependem de movimentos longitudinais durante certas fases do seu ciclo de vida (Larinier 2001).

Nos rios da região neotropical é comum observarmos espécies potamódromas, sendo elas principalmente das ordens Characiformes e Siluriformes. Estas espécies utilizam a região baixa dos rios como principal ambiente alimentar e, durante a estação chuvosa, migram para os trechos altos para reproduzir. Os alevinos encontram nas lagoas marginais um ambiente ideal para crescimento, tendo boa disponibilidade de

abrigo e alimento. Outro fator da migração reprodutiva é que o movimento não ocorre constantemente em um único sentido. Podem ocorrer avanços e recuos devido à exaustão e/ou repouso, linhas de corrente desfavoráveis, ou a estagnação devido à intransponibilidade, como é o caso de barragens desprovidas de Sistema de Transposição de Peixes (Martins 2000).

Na região neotropical os peixes têm sofrido imensos impactos com a construção de reservatórios, descarga de efluentes agrícolas, domésticos e industriais nos rios, e a degradação da mata ciliar. O ciclo biológico dessas espécies está relacionado aos ciclos hidrológicos dos rios, ou seja, os ciclos de cheias e secas, que também são alterados com o represamento. Acima da barragem a área está permanentemente inundada pelo reservatório e abaixo de barragem as cheias são reduzidas, ou ocorrem em períodos errados, alterando a conectividade entre o rio e áreas de reprodução, além de interferir no estímulo para a desova (Carosfeld *et al.* 2003).

Os efeitos das barragens em espécies de peixes vêm sendo documentados em todo o mundo (Morita & Yamamoto 2001, Neraas & Spruell 2001, Heggenes & Roed 2006, Reid *et al.* 2008) e por isso estudos que visam qualificar e quantificar esses impactos são freqüentemente observados. Geralmente, há um declínio da população devido à mudança de um ambiente de rio para um ambiente lacustre e também pelo isolamento dos peixes migratórios dos locais de desova e alimentação. Essa ruptura pode levar a uma extinção local caso os habitats críticos forem perdidos ou se tornarem inacessíveis (Godinho & Godinho 1994, Neraas & Spruell 2001).



Figura 8: Migração – migração ascendente de curimbas no rio Itapecerica, área metropolitana de Divinópolis, MG, durante a piracema de 2006/2007. Foto: Tiago Cerasim Pessali.

### **1.6) Sistemas de Transposição de Peixes**

Na tentativa de minimizar os efeitos causados por barragens os sistemas de transposição de peixes, é uma das principais estratégias de manejo que vem sendo utilizada pelas companhias hidrelétricas (Paiva 2007). O manejo racional de espécies de peixes deve prevenir a perda da diversidade genética. Para isso, é necessário se fazer um estudo genético e ecológico das mesmas, podendo auxiliar importantes decisões a serem tomadas, como aquelas relacionadas à adoção das duas medidas citadas.

A presença maciça de Usinas Hidrelétricas em rios altera suas características originais de corredeiras caudalosas para um ambiente quase lântico, efetivamente transformando a maior parte do rio em uma série de lagos artificiais (Godinho & Godinho 1994). Na tentativa de minimizar os efeitos causados por barragens, uma estratégia de manejo vem sendo muito utilizada pelas companhias hidrelétricas: os Sistemas de Transposição de Peixes, que são condutos de água capazes de dissipar a energia hidráulica, através ou à volta de um obstáculo, permitindo que o peixe possa

subi-lo sem estresse. Exemplos de STPs (Figuras 9 e 10) são as escadas, eclusas, elevadores, canais seminaturais de migração e caminhões com caçamba especial (Agostinho *et al.* 2008, Lopes & Bedore 2008 ).

Os registros mais antigos das estruturas para transposição de peixes foram feitos na Europa e datam do século XVII. As estruturas foram construídas com o objetivo de religar trechos de rios fragmentados, geralmente por barragens. Essas construções foram motivadas pela interferência dos barramentos na migração de salmonídeos. No Brasil, o primeiro Sistema de Transposição de Peixes foi uma escada construída em 1906, no rio Atibaia, na barragem de Salto Grande, no município de Campinas (São Paulo). Acredita-se que hoje existam mais de 50 STPs de peixes no país (Agostinho *et al.* 2008, Lopes & Bedore 2008, Pompeu *et al.* 2008). No estado de Minas Gerais, a legislação ambiental, artigo 1º da lei 12488 de 09/04/1997, torna obrigatória a construção de escadas para peixes de piracema em barragem edificada pelo estado. Segundo o parágrafo único deste artigo, o disposto não se aplica quando em virtude das características do projeto da barragem, a medida for considerada ineficaz ou desnecessária, ouvindo-se então o Conselho Estadual de Política Ambiental – COPAM.

A eficiência dos Sistemas de Transposição de Peixes ainda é controversa sob o ponto de vista da conservação da ictiofauna sul-americana, pois muitos foram implantados sem o conhecimento prévio da biologia, ecologia e genética das populações. Isso porque vários foram projetados seguindo os modelos adotados para salmonídeos, sendo que os peixes migradores sul-americanos apresentam ciclo de vida diferenciado, ocorrendo exclusivamente dentro do ambiente de água doce. Essas espécies requerem diferentes tipos de habitat tanto para a desova quanto para o desenvolvimento de juvenis e alimentação (Agostinho *et al.* 2008, Lopes & Bedore 2008, Pompeu *et al.* 2008).

A decisão sobre a construção ou não de mecanismos de transposição de peixes, deve ser alvo de diversos estudos que indiquem, não só, se a instalação destes mecanismos será ou não eficiente, bem como, o tipo de mecanismo que será necessário para que haja sucesso na conservação da ictiofauna nativa, considerando a existência de peixes de piracema a jusante, bem como as condições dos trechos a montante e a possibilidade efetiva da reprodução e do desenvolvimento inicial dos indivíduos jovens (Juras 2001). Diferentes espécies reagem aos obstáculos de forma diferente. Algumas, por exemplo, conseguem subir escadas, enquanto outras estabelecem populações distintas nos fragmentos disponíveis do rio depois da construção das barragens (Carolsfeld *et al.* 2003).

A lei 12.488 de 09/04/1997 torna obrigatória a construção de Sistemas de Transposição de Peixes (STPs) em barragens a serem edificadas em cursos d'água do estado de Minas Gerais, exceto, quando em virtude das características do projeto, a medida for considerada ineficaz. Além da lei 12.488, o artigo 20 do Decreto 38.744 de 09/04/1997 determina que para o licenciamento ambiental de novas usinas hidrelétricas, seja exigida a construção destes mecanismos. A construção de Sistemas de Transposição de Peixes ineficazes pode causar grandes prejuízos para a ictiofauna local. De acordo com Agostinho *et al.* (2004) e Agostinho (2007), os sistemas de transposição de várias Usinas Hidrelétricas do Brasil causam, na verdade, grandes impactos ambientais sobre os peixes de suas respectivas bacias.

Neraas & Spruell (2001), determinaram o efeito da fragmentação de habitat na estrutura genética de trutas (*Salvelinus confluentus*), causadas por usinas hidrelétricas no rio Fork (EUA), através da análise de microssatélites. Foi constatado que os indivíduos que se aglomeravam na base de uma barragem pertenciam às populações à montante da represa. Isso indica que esses indivíduos foram impedidos pela represa de realizar a migração, constatando a necessidade de mecanismos de transposição.

Taylor *et al.* (2003), também demonstraram através de microssatélites, que populações de outra espécie de truta (*Oncorhynchus clarki lewisii*) de diferentes locais de uma bacia no Canadá eram compostas de unidades demográficas distintas. Isso se deve ao fato de que a maioria da variação molecular foi observada entre populações e devido também a alta frequência de alelos restritos a algumas populações. Além disso, a significativa divergência entre populações acima e abaixo de barreiras é consistente com o isolamento físico e independência demográfica, o que ressalta que procedimentos de manejo devem levar em conta populações isoladas.

### **1.7) Repovoamento**

O repovoamento (Figuras 11 e 12), que consiste na reprodução de peixes em cativeiro e reintrodução nas represas e rios, é uma das estratégias mais utilizadas para mitigar os impactos de represamentos hidrelétricos sobre a ictiofauna (Agostinho *et al.* 2007). No Brasil, ele vem sendo empregado desde a década de 1970 na tentativa de restaurar as populações de peixes e manter ou aumentar a produção pesqueira (Vieira & Pompeu 2001), embora envolva riscos relativos à eficiência do programa quanto aos seus resultados, à preservação do *pool* gênico e à possibilidade de introdução de doenças, além de outros aspectos ecológicos e econômicos (Hickley 1994).

A partir dos anos 1950, estímulos à criação de pisciculturas começaram a existir. O Decreto-Lei número 794, de 19 de outubro de 1938, já previa que as barragens deveriam ter, como complemento obrigatório, obras ligadas à conservação da fauna fluvial, seja facilitando a passagem de peixes, seja instalando estações de piscicultura. Sendo que a finalidade dessas estações era a produção de alevinos para o repovoamento (Lopes & Bedore 2008).

Inicialmente, os programas de repovoamento implementaram a soltura de espécies não-nativas ou exóticas com o objetivo da manutenção pesqueira nos trechos de rio mais afetados pelos barramentos. A partir da década de 80, os propósitos destes programas se alteraram, sendo o objetivo principal: a soltura de espécies nativas para a sua manutenção em ambientes afetados pelas barragens (Agostinho *et al.* 2008, Lopes & Bedore 2008).

De acordo com Sato & Godinho (2004), desde 1983 cerca de 7 milhões de alevinos de *Prochilodus argenteus*, *P. costatus*, *Leporinus elongatus*, *Brycon orthotaenia*, *Salminus brasiliensis* e *Pseudoplatistoma corruscans* foram produzidos e soltos na região à montante da barragem de Três Marias pela Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, pertencente à CODEVASF. Embora o peixamento na região já venha sendo feito a quase 3 décadas e não existam relatos quantitativos de sua eficiência, há indicações de que populações de *B. orthotaenia*, têm povoado essa região vagarosamente desde o início de sua reintrodução em 1988, sendo que esta espécie estava praticamente extinta localmente. *P. argenteus*, *P. costatus* e *L. elongatus* aumentaram em abundância desde os anos 80 e eram raros nas capturas naquela região (Carvalho-Costa 2006, Sato & Godinho 2004).

Apesar de o repovoamento ser amplamente utilizado para a restauração de populações (Araki *et al.* 2007), a influência do mesmo sobre populações de peixes é pouco conhecida quando utilizada isoladamente (Madeira *et al.* 2005, Salvanes & Braithwait 2006, Fraser 2008). Quando realizados de forma não sistemática e planejada, os repovoamentos podem ter efeitos adversos nas populações naturais (Miller & Kapuscinski 2003).

Um programa de repovoamento tem que ter como base a preservação da variabilidade genética do ambiente natural, aumentando assim, o sucesso adaptativo da espécie dentro de um ambiente de contínuas alterações. A opção pelo repovoamento deve, portanto, levar em consideração a variação genética existente dentro e entre populações distribuídas na bacia de influência do reservatório. Esta etapa é fundamental para o estabelecimento e a manutenção dos estoques fundadores na estação de reprodução, que deverão representar a distribuição da variabilidade genética da espécie da região. Assim, a compreensão das diferenças genéticas entre



as diversas populações nativas, bem como a composição das mesmas em cativeiro é uma etapa fundamental para a manutenção de estoques e possibilita um manejo genético em longo prazo de espécies de peixes em programas de repovoamento (Hiltsdorf & Krieger 1998).



Figura 9: Sistema de Tranposição de peixes - escada de peixes da Usina de Igarapé, rio Paraopeba, MG. Foto: Carlos Bernardo Mascarenhas.

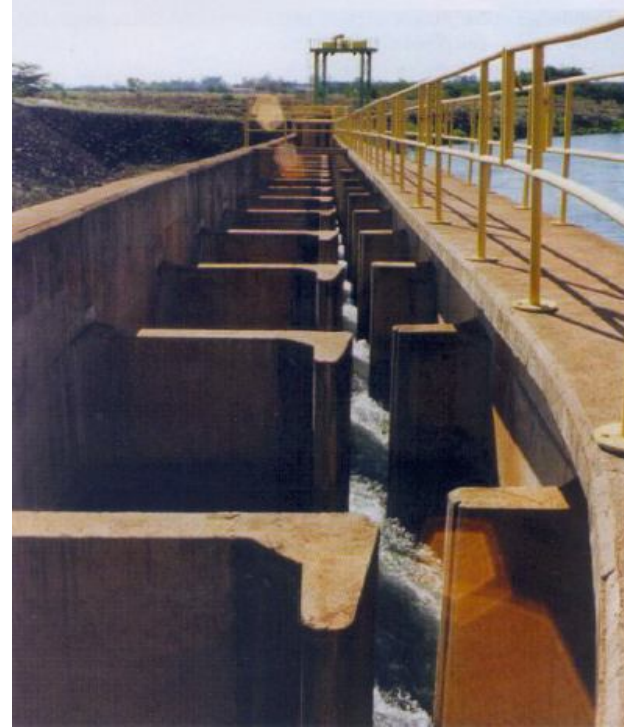


Figura 10: Sistema de Tranposição de peixes - vista parcial da escada de peixes da barragem de Igarapava, rio Grande, MG, mostrando no canto inferior direito o local por onde os peixes entram. Foto: Luiz Gustavo Martins da Silva.



Figura 11: Repovoamento - liberação de alevinos na UHE Volta Grande, rio Grande, MG. Fonte: CEMIG.



Figura 12: Repovoamento - liberação de alevinos na UHE Volta Grande, rio Grande, MG. Fonte: CEMIG.

## 1.8) Manejo de recursos pesqueiros em UHEs no Brasil

Historicamente, o manejo de recursos pesqueiros no Brasil não possuía o amparo de estudos técnicos e científicos que pudessem avaliar sua real efetividade e fornecessem informações concretas para o aperfeiçoamento da técnica (Agostinho *et al.* 2008, Lopes & Bedore 2008, Pompeu *et al.* 2008).

A legislação de número 2.250, de 28 de dezembro de 1927, do estado de São Paulo, foi a primeira no país relacionada ao manejo da pesca em reservatórios. Ela tornou obrigatória a instalação de escada para a transposição de peixes em todas as barragens (Artigo 16) (Agostinho *et al.* 2008).

Em meados dos anos 30, surgiu uma demanda para a construção de estações produtoras de alevinos para o repovoamento e diversas pisciculturas foram construídas no país. A Superintendência do Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE) tornou obrigatória, através da Resolução 46, de 27 de janeiro de 1971, a construção de estações de pisciculturas em cada uma das sub-bacias que tivessem represamentos (Agostinho *et al.* 2008).

A Resolução Conama 001/86, de 23/01/1986 instituiu o Estudo Prévio de Impacto Ambiental e o Relatório de Impacto Ambiental (EIA-RIMA); um procedimento obrigatório para a obtenção de licença a empreendimentos com relevante potencial de degradação ambiental. A elaboração desses relatórios representa um importante passo na gestão dos recursos pesqueiros, visto que implica na elaboração de estudos e avaliações prévias antes de se tomar qualquer decisão (Agostinho *et al.* 2008).

Nos últimos anos, vem se observando uma crescente preocupação com a qualidade genética do plantel produzido nas pisciculturas e algumas estações, como por exemplo, a CODEVASF, tem substituído sempre as matrizes utilizadas para a reprodução por novos indivíduos selvagens, visando um aumento do *pool* gênico das populações. O inadequado perfil genético do plantel de reprodutores de parte das estações pode ter contribuído para a aceleração da degeneração genética dos estoques naturais. Atualmente, sabe-se que programas de repovoamento que utilizam peixes selvagens como matrizes podem produzir alevinos com diferenças mínimas em relação aos selvagens quando se tratando de *fitness* populacional (Araki 2007).

Hoje, para empresas como a CEMIG, a busca por alevinos na piscicultura convencional constitui-se em uma preocupação adicional visto que há uma exigência de manutenção de sua variabilidade para a estocagem e para que isso ocorra, se faz necessário um estudo genético prévio das matrizes utilizadas.

### 1.9) O gênero *Prochilodus*

O gênero *Prochilodus* é de grande relevância considerando que suas espécies estão entre os peixes de água doce mais abundantes, conspícuos e amplamente distribuídos em rios sul americanos. Eles são muito importantes para a pesca comercial e de subsistência em muitas partes do continente, constituindo 50-90% da biomassa total de peixes em determinadas regiões. No reservatório de Jupuíá, no rio Paraná, por exemplo, *P. lineatus* apresentou resultados significativos na pesca comercial (Welcomme 1979, Bowen 1983, Bonetto 1986, CESP 1996, Sivasundar 2001). A maioria desses peixes realiza migrações de longa distância durante a estação chuvosa para as áreas de desova próximas às cabeceiras dos rios. A desova ocorre nas águas abertas do canal principal do rio e suas larvas derivam passivamente para as áreas inundadas. Os juvenis permanecem nas planícies alagadas até amadurecerem (Agostinho *et al.* 1993).

O gênero é constituído de espécies detritívoras e iliófagas (se alimentam de lodos, detritos, pequenos crustáceos e de suas larvas nos fundos lamacentos), de tamanho médio a grande (Petrere 1989). Relatos destas longas migrações, até 1200 km por ano, já haviam sido feitos por Bonetto (1963). Durante o ciclo anual, eles nadam rio acima, das planícies alagadas onde se alimentam, para as cabeceiras dos rios, para a desova, antes do término do período das chuvas (Sivasundar *et al.* 2001).

As espécies de *Prochilodus* possuem características reprodutivas em comum, tais como a desova total e alta fecundidade, fecundação externa e ausência de cuidado parental (Lowe-MacConnell 1999).

Castro (1990) distingue 13 espécies em uma revisão do gênero *Prochilodus*, nos principais rios sul americanos. A taxonomia restringe a maior parte das espécies a uma única bacia e devido a alta vagilidade (tendência de um organismo ou população de mudar sua localização ou distribuição com o tempo), cada bacia teria uma única população panmítica. Com exceção da bacia do São Francisco com duas espécies descritas (*Prochilodus argenteus* e *P. costatus*) e o alto rio Paraná e alto rio Uruguai com duas espécies simpátricas (*P. lineatus* e *P. vimboides*). Castro (1990) identificou uma nova espécie, *Prochilodus britskii*, com distribuição restrita a apenas um tributário do rio Tapajós na bacia Amazônica. Nesta bacia já havia sido descrita uma espécie, *P. magdalena*, com vasta distribuição geográfica, ocorrendo em toda bacia.

*Prochilodus lineatus* (Castro 1990) (Figura 13) pertence à família Prochilodontidae (Characiformes), ocorre na bacia do Paraná-Paraguai e do rio Paraíba do Sul e é um dos peixes mais importantes para a pesca na bacia do Grande (Castro & Begossi 1996). Comumente conhecido como curimba, curimatá, curimatá,

curimatã, é um típico peixe de piracema, ou seja, o adulto realiza migrações reprodutivas rio acima na estação chuvosa (novembro-março) e os ovos e larvas derivam passivamente junto com a correnteza por dezenas de quilômetros rio abaixo. Quanto à morfologia, a espécie possui hábitos bentopelágicos (vive e se alimenta nas camadas médias e mais fundas da água), possui boca em forma de ventosa, situada na região mais ventral da cabeça, provida de dentículos (Magalhães 1931) e escamas ctenóides (Castro 1990).

*Prochilodus costatus* (Valenciennes 1850) (Figura 14) pertence à família Prochilodontidae, ordem Characiforme, e é uma espécie inicialmente endêmica da bacia do rio São Francisco, mas que foi posteriormente introduzida no rio Jequitinhonha (Castro & Vari 2003). É conhecida comumente como Curimatá ou Curimatã-pioa. O *P. costatus* é um peixe de piracema. Os adultos realizam deslocamentos em cardumes, chamadas de migrações reprodutivas, rio acima na estação chuvosa e os ovos e larvas derivam passivamente junto com a correnteza, por dezenas de quilômetros rio abaixo. A espécie possui um importante papel ecológico considerando seus hábitos bentopelágicos e detritívoros, ou seja, ela vive e se alimenta nas camadas médias e mais fundas de água, se alimentando de detritos orgânicos, desenvolvendo um papel importantíssimo na ciclagem de matéria orgânica em ecossistemas límnicos (Flecker 1996, Darnell 1964), sendo uma espécie chave para programas de conservação.

*Prochilodus argenteus* (Spix & Agassiz 1829) (Figura 15) pertence à família Prochilodontidae, ordem Characiforme, e é uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco. *P. argenteus* se destaca por ser a espécie de piracema mais abundante na região de Três Marias (Minas Gerais), representando cerca de 50% de toda produção de pescado (Sato *et al.* 1996, Godinho & Godinho 2003).

Possui hábito alimentar iliófago, desova total, período reprodutivo estendendo-se de novembro a janeiro (estação chuvosa), coincidindo com a época de cheias, altas temperaturas e longos fotoperíodos. A espécie é a que possui maior porte da família, podendo atingir até 15 Kg de peso corporal (Sato *et al.* 1996, Godinho & Godinho 2003).



Figura 13: Indivíduo adulto de *P. lineatus*. Foto: Alessandra Gomes Bedore



Figura 14: Indivíduo adulto de *P. costatus*. Foto: Carlos B. M. Alves



Figura 15: Indivíduo adulto de *P. argenteus*. Foto: Carlos B. M. Alves

Estudos sobre os hábitos migratórios, biologia geral e reprodutiva de *P. lineatus* na bacia do rio Grande foram realizados por Godoy (1954, 1957, 1959, 1967, 1972 e 1975). Foram obtidos importantes dados nestes trabalhos como 27.000 marcações físicas de indivíduos jovens e adultos de curimatã, mais de 2.000 devoluções de marcas, podendo-se sugerir uma estrutura física para o rio, a qual delinearía os padrões de migração, em função de barreiras naturais, como cachoeiras, que só eram efetivamente transpostas em situações de cheias atípicas. Godoy (1959) constatou que o alto rio Mogi Guaçu (tributário do rio Pardo), entre a cachoeira de Emas e o Salto de Pinhal constituíam o local de reprodução dos peixes que atingiam essa zona. Já no médio rio Grande, entre as cachoeiras de Patos, Marimbondo e a barragem de Peixoto, formavam o sítio de alimentação, crescimento e engorda de grande parte dos peixes que desovavam no rio Mogi Guaçu. Foi possível constatar por Godoy (1972) a migração de indivíduos de até 1.110 km em um ano, entre os rios Grande, Pardo e Mogi Guaçu, sendo que indivíduos de curimatã nadam entre cerca de 10 a 16 km por dia na época reprodutiva. Relatos dessas longas migrações realizadas pelas curimbas já haviam sido feitos por Bonetto (1963).

Estudos realizados por Godoy (1959) e Silva (2004) relatam a existência de dois comportamentos migratórios distintos em curimatã: um em que poucos indivíduos prontamente continuam subindo o rio, após a transposição, e outro onde indivíduos permaneceram nas proximidades do local de soltura, por até alguns meses, antes de iniciarem seu deslocamento rio acima. Capeleti & Petrere (2006) monitoraram o movimento de curimbas no Mogi-Guaçu na escada de peixes da cachoeira das Emas e observaram aspectos de uma leva migratória tardia (março e abril), que parece não ter caráter reprodutivo e onde os peixes eram menores do que dos meses precedentes, no entanto, constituindo uma importante parte da biomassa dos indivíduos migrantes.

Um estudo objetivando diferenciar geneticamente populações de *Prochilodus lineatus* na bacia do rio Paraná utilizando como marcador molecular, isoenzimas (12 loci) foi realizado por Revaldaves *et al.* (1997). Os autores avaliaram a variabilidade genética de 160 indivíduos pertencentes aos rios Paraná, Baía e Ivinheima. O trabalho apontou uma similaridade genética entre as populações ( $F_{ST} = 0.018$ ), que foi interpretada como sendo indício de altas taxas de fluxo gênico entre peixes das diferentes localidades.

Sivasundar *et al.* (2001) realizaram estudos de filogeografia em quatro grandes bacias sul-americanas (Orinico, Magdalena, Amazônica e Paraná) utilizando-se espécies do gênero *Prochilodus*. As análises foram realizadas através de seqüências de genes mitocondriais. Constatou-se que cada bacia constituía grupos monofiléticos



distintos e se estabeleceu relações de genealogia entre eles, que sugeriu que a expansão do gênero se deu a partir de regiões mais setentrionais, até as mais meridionais. Neste trabalho os autores também realizaram uma análise populacional em 26 indivíduos de *P. lineatus* dentro da bacia do Paraná, utilizando-se a região controle de replicação do DNA mitocondrial. Cada indivíduo apresentou um haplótipo distinto, mas a distribuição filogeográfica dos haplótipos não seguia a distribuição esperada de acordo com o arranjo espacial das localidades originárias de cada um. Esses resultados foram apontados como evidências de amplo fluxo gênico dentro da bacia hidrográfica e a falta de estruturação genético-populacional para esta espécie dentro da área estudada na bacia do Paraná. Esses resultados se apresentaram em consonância com os de Revaldaves *et al.* (1997).

Ramella *et al.* (2006) realizou uma descrição preliminar de 11 indivíduos de *P. lineatus* do rio Uruguai, na bacia Platina com uso de marcadores RAPD. Essa técnica também foi empregada no estudo da espécie *P. marggravii* (Hatanaka & Galetti 2003) e de *P. argenteus* (Hatanaka *et al.* 2006) no rio São Francisco, para elucidar a possível existência de estrutura genética populacional desses na região da barragem de Três Marias.

Marcadores microssatélites para o gênero *Prochilodus* foram isolados e descritos por Carvalho (2002), Hatanaka *et al.* (2002), Barbosa *et al.* (2006) e Yazbeck & Kalapothakis (2007), sendo que em todos os trabalhos os marcadores se mostraram importantes ferramentas para análise populacional do gênero.

Carvalho-Costa *et al.* (2006) utilizou 6 *loci* de marcadores microssatélites em uma análise de diversidade genética de *P. costatus* a jusante da UHE Três Marias, constatando uma falta de subestruturação populacional na região.

### **1.10) Marcadores Moleculares**

As ferramentas moleculares são os mais modernos e efetivos recursos que têm possibilitado análises genéticas em larga escala, se tornando de uso rotineiro em muitos laboratórios do mundo (Poke *et al.* 2005). Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (Ferreira & Grattapaglia 1996). Eles são regiões do DNA que contém polimorfismos (de seqüência ou de comprimento) e que apresentam grande variação entre os indivíduos, sendo assim, facilmente utilizadas em estudos e análises de diferenciação entre os mesmos. De acordo com Ferreira *et al.* (1998), ao se verificar o padrão de herança do marcador, de acordo com as leis de herança mendeliana, um determinado marcador é definido

como marcador genético. Os marcadores moleculares genéticos estão sendo amplamente utilizados entre os biólogos e a escolha do marcador a ser utilizado depende da natureza da informação (dominância, co-dominância, ploidia), dos equipamentos disponíveis em laboratórios e do nível de variabilidade do marcador, ou seja, se ele é muito ou pouco polimórfico (Anne 2006). A grande vantagem do uso de marcadores nucleares que se encontram em regiões não codificantes, é seu alto grau de polimorfismo, ou seja, os *loci* são geralmente caracterizados por uma alta heterozigosidade (Ellegren 2004, Schlötterer 2000, Zane *et al.* 2002). Praticamente todas as mutações irão contribuir para o polimorfismo (a não ser que o *locus* esteja próximo a uma região codificante), enquanto que a maioria das mutações é eliminada por seleção em marcadores que estão em regiões codificantes (Chenuil 2006).

Hoje, estão disponíveis várias técnicas de biologia molecular para a detecção de variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA, como por exemplo, RFLP, AFLP, RAPD, minissatélites, microssatélites, dentre outros (Parker *et al.* 1998) e com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, novos marcadores vêm sendo localizados em regiões do genoma nuclear e mitocondrial. Esses marcadores são aplicados a um grande número de questões biológicas como: reconstruções filogenéticas, testes de paternidade, aplicações na área forense, mapeamento e estudos genéticos de populações. Dentro da genética da conservação, eles têm sido úteis no planejamento e monitoramento de programas de reprodução em cativeiro, no entendimento de sistemas de acasalamento, na detecção da estrutura geográfica da variabilidade genética, no manejo de fluxo gênico e no entendimento de fatores que contribuem para o aumento ou declínio do *fitness* (Vrijenhoek 1998).

Desde a última década, os microssatélites tornaram-se um dos marcadores moleculares mais utilizados em análise populacional (Schlötterer 2004). Os marcadores microssatélites caracterizam-se por blocos repetitivos de seqüências idênticas ou similares dispostas em *tandem*, encontrados em todos os genomas eucariotos estudados até o momento (Zane *et al.* 2002). O potencial de se utilizar esses marcadores por meio de amplificação por PCR abriu as portas para uma ampla gama de aplicações nas Ciências Biológicas e, particularmente, na genética de populações (Jarne & Lagoda 1996, Sunnucks 2000). Esse fato se deve a suas características úteis à genética populacional, como seu caráter mendeliano, sua hipervariabilidade (grande número médio de alelos por *locus*), seus altos valores de Heterozigosidades ( $H$ ), quanto pelo rápido desenvolvimento de metodologias estatísticas para se analisar dados de microssatélites (Sunnucks 2000, Ellegren 2004). Tais marcadores moleculares são constituídos por seqüências nucleotídicas de 2 a 6 pb repetidas muitas vezes, tendo uma disposição estabelecida de modo bem aleatório

(Hearne *et al.* 1992). O mecanismo mutacional é conhecido como “*DNA replication slippage*” e consiste no desalinhamento das duas fitas de DNA durante a replicação, levando a formação de alças nas fitas, o que pode gerar um aumento ou diminuição do número de repetições (Ellegren 2004). Suas taxas de mutação são, de maneira geral, da ordem de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ , duas a quatro vezes maiores do que o conhecido para as isoenzimas (Estoup *et al.* 1998, Schlötterer 2000). Para humanos tem sido descritas taxas entre  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  (Lai & Sun 2003) e para salmonídeos, por exemplo, entre  $10^{-2}$  e  $10^{-5}$  (Angers & Bernatchez 1997).

A distribuição e o tamanho de *loci* de microssatélites são altamente variáveis entre populações e até mesmo entre indivíduos (Ellegren 2004). As seqüências de microssatélites não só variam no comprimento da unidade de repetição e no número das mesmas, mas também no rigor com que eles estão em conformidade com um padrão de repetição incrementado. Os microssatélites são muitas vezes divididos em categorias com base no padrão de repetição. Elas podem ser perfeitas ou imperfeitas; simples ou compostas. Nas repetições simples, a variação entre diferentes alelos se dá pela diferença de comprimento de segmentos de DNA, em função de diferentes números de temas repetidos lado a lado. Já nas compostas, também chamadas de repetições complexas, podem conter vários blocos de unidade de comprimento variável repetidos, assim como seqüências intervenientes variáveis. Complexas repetições hipervariáveis são uma categoria de marcadores microssatélites com numerosos alelos não consensuais que diferem tanto em tamanho quanto em seqüência, possuindo assim, altas taxas de mutação, sendo altamente polimórficos em populações naturais detectadas, podendo-se utilizar apenas um marcador para a realização de estudos populacionais (Urquhart *et al.* 1993, Gill *et al.* 1994, Lászick *et al.* 2001, Reid *et al.* 2003, Butler *et al.* 2009).

Comparando-se microssatélites e isoenzimas em populações de *Salmo trutta*, Estoup *et al.* (1998) constatou que os microssatélites detectaram diferenças genéticas não registradas pelas isoenzimas. A correlação entre a distância geográfica e genética foi significativa no caso dos microssatélites e não significativa no caso de isoenzimas. Isso sugere que marcadores genéticos mais polimórficos como os microssatélites são mais indicados para detectar isolamento por distância entre populações relacionadas. Uma grande vantagem dos microssatélites em relação a outros tipos de marcadores como RAPD e AFLP é que os microssatélites são co-dominantes, ou seja, é possível identificar os dois alelos de um *locus*. Além disso, outra desvantagem do RAPD é a dificuldade de repetição dos resultados em alguns casos.

Quando comparados marcadores microssatélites a marcadores mais recentes como os SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*), foi constatado que duas ou três

vezes mais SNPs do que *loci* microssatélites são necessários para obter resultados comparáveis para o mapeamento ou identificação de indivíduos. Além disso, uma vez isolados, microssatélites acima de um determinado número de repetições são geralmente polimórficos. Já o isolamento de SNPs requer a identificação de sítios polimórficos em um conjunto de várias seqüências (Schlötterer 2004). Em estudo realizado por Ryynanen *et al.* (2007), comparou-se marcadores bi-alélicos (indel e SNPs) com marcadores microssatélites de salmão (*Salmo salar*) e pôde-se observar que os microssatélites são marcadores mais adequados para estudos de diversidade genética.

Enquanto o DNA mitocondrial tem sido mais eficiente em estudos genealógicos e evolutivos de populações devido a suas características padrões de herança materna e clonal, além de apresentar alta taxa de mutação (Wilson *et al.* 1985, Avise 2004), e o DNA *Barcoding* para classificar indivíduos desconhecidos em uma determinada espécie e ajudar a taxonomia no descobrimento de novas espécies (Herbert *et al.* 2003, Stoeckle 2003), os microssatélites têm se revelado melhores para análise de dinâmica e estrutura genético-populacional. Para uso em análises intraespecíficas, os microssatélites têm superado tanto marcadores mitocondriais como outros que eram aplicados correntemente. Entre 1758 artigos e *primers notes* publicados entre os anos 1992 a 2001 na revista *Molecular Ecology*, 42,5% estão indexados com marcadores microssatélites (Hansen *et al.* 2001).

Diversos exemplos e estudos de caso utilizando os marcadores microssatélites são descritos em Frankham *et al.* 2002, Avise 2004 e Allendorf & Luikart 2007. Eles têm sido aplicados a uma série de estudos relevantes à conservação, como análise de estrutura genética populacional, taxas de fluxo gênico, determinação de paternidade, estimativas de tamanhos efetivos populacionais atuais e históricos, determinação de aspectos históricos de vida e padrões migratórios, determinação de variabilidade genética intrapopulacional, determinação de unidades taxonômicas operacionais, detecção de híbridos, entre outros.

Desde a década de 60, marcadores morfológicos e protéicos têm sido usados no estudo da variabilidade populacional em peixes. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, diversos marcadores vêm sendo localizados em regiões do genoma nuclear e mitocondrial. Assim, os marcadores moleculares têm se transformado em ferramentas importantes no estudo e avaliação genética de populações de peixes selvagens e em cativeiro (Hiltsdorf & Krieger 1998). No Brasil, estudos genéticos que utilizam essas ferramentas para o estudo populacional de peixes vêm crescendo (Dergam *et al.* 2002, Yazbeck & Kalapothakis 2007, Paiva & Kalapothakis 2008). O isolamento e a caracterização de marcadores moleculares

constituem etapas fundamentais, pois permitem avaliar a estrutura e a variabilidade genética de populações de peixes nativos e de cativeiro, bem como o impacto que as barragens e o repovoamento causam sobre elas (Yazbeck & Kalapothakis 2007, Araki *et al.* 2007, Paiva & Kalapothakis 2008, Barbosa *et al.* 2008, Carvalho-Costa *et al.* 2008) e propor medidas mais indicadas para a manutenção da diversidade das comunidades de peixes além de acelerar e aumentar a exatidão das decisões tomadas para a conservação e manejo das espécies em questão.

### **1.11) Efeitos genéticos nas populações de curimbas dos rios Paraopeba, Pará e Grande:**

Atualmente, através da análise genético-populacional, imensamente facilitada pelo uso de marcadores de DNA, como microsatélites e DNA mitocondrial (mtDNA), pode-se estimar níveis de fluxo gênico históricos e recentes entre populações, avaliar a distribuição da variabilidade genética total dentro e entre populações e inferir sobre o tempo de isolamento entre elas (Sunnucks 2000). O manejo de populações fragmentadas ainda é raro, mas é uma das mais importantes questões em genética da conservação (Frankham 2003).

A construção de barragens em um rio pode levar a alteração de populações selvagens de peixes por impedir o fluxo de indivíduos entre populações, além de bloquear as rotas migratórias. De acordo com Balloux & Moulin (2002), a troca de genes entre populações homogeniza as frequências alélicas entre essas populações e determina os efeitos relativos da seleção e da deriva genética.

No caso dos rios Paraopeba, Pará e Grande, como ocorreu a construção de barragens (hoje são 3 no rio Paraopeba, 2 no rio Pará e 13 no rio Grande), houve um bloqueio do movimento migratório de algumas espécies de peixes ao longo dos mesmos. Isso pode, potencialmente, levar a uma subdivisão populacional, através da interrupção do fluxo gênico entre grupos de indivíduos isolados a jusante e a montante das barragens, podendo contribuir para uma diminuição do tamanho efetivo populacional, aumentando as chances de deriva que, por sua vez, levará à perda de variabilidade genética dentro das populações e à diferenciação entre as populações, diminuindo a probabilidade de persistência de populações importantes para a atividade pesqueira, ou sob ameaça de extinção (Frankham 1996, Vrijenhoek 1998, Neraas & Spruell 2001). A perda da variabilidade genética influencia nas chances de extinção de uma espécie, por ser essencial à capacidade das populações responderem a mudanças ambientais, como, por exemplo, o surgimento de uma doença (Waples *et al.* 1990, Reed & Frankham 2003).

Outro efeito genético potencial advindo da fragmentação de rios é um aumento da frequência de acasalamentos consangüíneos (endogamia), que levam ao surgimento de depressão endogâmica, que é a perda de valor adaptativo médio populacional em função do aumento da frequência de homozigotos para alelos deletérios ou letais. Alguns autores sugerem que fatores genéticos contribuem para o risco de extinção em espécies ameaçadas, uma vez que a endogamia reduz o sucesso reprodutivo, a sobrevivência e a perda de diversidade genética, reduzindo a habilidade de populações responderem às mudanças ambientais (DeSalle 2005, Frankham 2003).

Os níveis de heterozigosidade geralmente estão relacionados com parâmetros importantes na sobrevivência das espécies, como a eficiência reprodutiva e resistência a doenças (Matioli 2001). Ao contrário do que alguns acreditam, mudanças genéticas e diferenças significativas na resposta fenotípica ocorrem não apenas em uma escala evolutiva. Mudanças marcantes podem ocorrer em poucas décadas se as populações forem expostas à intensa pressão seletiva ou estiverem muito sujeitas a deriva (Carvalho 1993).

A implementação de barragens pode levar a alterações radicais nas condições naturais do rio levando a uma mudança de ambiente lótico para ambiente lêntico e podendo impor novos regimes de seleção às populações de peixes impactadas, eventualmente levando à diferenciação populacional dentro do rio ou da bacia (Heggenes & Røed 2006). Por outro lado, devido à existência prévia de obstáculos naturais nos locais onde hoje se encontram algumas barragens, há a possibilidade de que populações geneticamente distintas, anteriormente isoladas por esses obstáculos e que possuem adaptações locais importantes, passem a ser misturadas pela implementação errônea de sistemas de transposição de peixes de jusante para montante, ocasionando o rompimento dessas adaptações específicas e diminuindo o valor adaptativo médio populacional, podendo levar a uma depressão exogâmica (Lenormand 2002).

Outro aspecto relevante da genética populacional das curimatãs é a realização dos peixamentos (introduções de peixes oriundos de pisciculturas nos reservatórios). Quando realizados de forma não sistemática e planejada, os peixamentos podem ter efeitos adversos nas populações naturais (Miller & Kapuscinski 2003, Utter 2003). Um risco potencial é a depressão exogâmica que pode ocorrer devido à introdução de genes exógenos na população levando à perda de adaptações locais específicas importantes para a os indivíduos nativos (Lenormand 2002, Garant *et al.* 2003).

Outra questão que deve ser analisada é a mistura de dois estoques distintos de peixes que pode ter implicações ecológicas diretas na viabilidade de cada grupo.

Quando surge uma F1 oriunda da reprodução de um estoque misto, esta passa a ser denominada admistura (Kalinowski 2004). Nessas populações mistas é possível observar o fenômeno da introgressão genética, que é a troca de alelos privados ou exclusivos entre duas formas distintas, através de retrocruzamentos entre formas híbridas com uma das duas formas originais (Billington 2003).

Dessa forma é necessária à implementação de programas de manejo e conservação em espécies sujeitas à fragmentação por impacto antropogênico e/ou peixamentos, e que só serão realmente eficazes considerando os fatores genéticos de cada população estudada (Frankham 2003).

O trabalho desenvolvido e descrito nessa tese gera resultados aplicados de uso imediato. Apresentam ainda a vantagem de serem utilizados a médio e longo prazo podendo subsidiar futuras decisões sobre estruturação e diversidade populacional, repovoamento e instalação ou não de sistemas de transposição de peixes.

Os resultados deste trabalho estão divididos da seguinte maneira: sequenciamento e análise de clones positivos; estudo genético das matrizes da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG), Minas Gerais: reprodução induzida e marcação com microchip; amplificação e análise do locus 2V35; subclonagem do produto da *Nested* PCR em plasmídeo pCR TOPO Invitrogen; análise dos sequenciamentos automáticos de DNA; análises estatísticas dos dados, sendo essas realizadas separadamente para as amostras do rio Paraopeba, amostras do rio Pará, amostras do rio Grande e amostras de *Prochilodus* spp. dos três rios.

## **2) OBJETIVOS:**

### **2.1) Objetivo Geral:**

Este trabalho tem como objetivo caracterizar a diversidade genética e estrutura populacional de três espécies do gênero *Prochilodus* (*P. costatus*, *P. argenteus* e *P. lineatus*) em três Bacias Hidrográficas do estado de Minas Gerais, que nas últimas décadas foram alteradas pela construção de diversas represas.

### **2.2) Objetivos Específicos:**

Desenvolvimento de técnica para análise de DNA que permita:

a) Determinar o perfil genético de matrizes de *Prochilodus lineatus* utilizadas em repovoamentos pela CEMIG, provenientes da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG), rio Grande, Minas Gerais.

b) Caracterizar a diversidade genética das populações de *Prochilodus costatus*, *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus argenteus* considerando tanto as matrizes utilizadas nos programas de repovoamento quanto as populações presentes nos rios Paraopeba e Pará, Minas Gerais.

c) Caracterizar a estrutura populacional das três espécies em questão considerando tanto as matrizes utilizadas nos programas de repovoamento quanto as populações presentes nos rios Paraopeba e Pará.

Desenvolvimento de técnica metodológica que permita:

a) Formar um banco de DNA e de dados genéticos das matrizes de *P. lineatus* utilizadas no programa de repovoamento da CEMIG - Estação Ambiental de Volta Grande, Minas Gerais

b) Formar um banco de DNA e de dados genéticos dos exemplares de *P. costatus* e *P. argenteus* coletados nos rios Paraopeba e Pará, Minas Gerais.

### **3) METODOLOGIA:**

#### **3.1) Material coletado**

##### **3.1.1) Rio Paraopeba**

Foram coletados no rio Paraopeba, Minas Gerais, 89 tecidos de nadadeiras caudais de exemplares adultos da espécie *Prochilodus costatus* e 32 de exemplares adultos da espécie *P. argenteus* e o respectivo material fixado em Etanol 70% (P.A.). A coleta foi realizada durante duas campanhas (Novembro 2008 a Março 2009 e Julho 2009 a Agosto 2009) pela equipe do biólogo Fábio Pereira Arantes, da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, através de projetos colaborativos.

As amostras foram coletadas antes da implantação da UHE Retiro Baixo em 5 sítios distintos a jusante da Usina Termelétrica de Igarapé (Figura 2, Tabela1). O sítio I está localizado imediatamente a jusante da Usina Termelétrica de Igarapé, e os outros



4 sítios estão localizados em lagoas marginais pertencentes ao rio Paraopeba: rio Velho (sítio II), Chiqueiro (sítio III), Piranhas (sítio IV), e Barra do rio (sítio V).

Tabela 1. Sítios de coleta, número de amostras, e coordenadas geográficas das amostras de *Prochilodus costatus* e *Prochilodus argenteus* na bacia do rio Paraopeba. Todos os peixes foram coletados no período de 2008 a 2009.

Espécie	Sítios de coleta	Tamanho amostral	Coordenadas geográficas	
<i>P. costatus</i>	Rio Paraopeba (I)	37	19°57'40.83"S	44°16'57.16"W
<i>P. argenteus</i>		4		
<i>P. costatus</i>	Lagoa marginal rio Velho (II)	9	19°34'50.40"S	44°33'14.20"W
<i>P. argenteus</i>		10		
<i>P. costatus</i>	Lagoa marginal Chiqueiro (III)	23	19°21'52.50"S	44°32'26.50"W
<i>P. argenteus</i>		3		
<i>P. costatus</i>	Lagoa marginal Piranhas (IV)	10	19°20'24.50"S	44°34'10.80"W
<i>P. argenteus</i>		5		
<i>P. costatus</i>	Lagoa marginal Barra do	10	18°51'18.41"S	44°51'29.55"W
<i>P. argenteus</i>	Rio (V)	10		

### 3.1.2) Rio Pará

Foram coletados 45 tecidos de nadadeiras caudais de exemplares da espécie *Prochilodus costatus* e o respectivo material fixado em Etanol 70% (P.A.). A coleta foi realizada pela equipe de biólogos do Professor Doutor Gilmar Bastos Santos, da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, através de projetos colaborativos. As amostras foram coletadas entre os municípios de Carmo do Cajurú e Divinópolis, MG, à jusante da Usina Hidrelétrica de Gafanhoto, no trecho entre as Usinas Hidrelétricas de Gafanhoto e Cajurú e na Barragem de Cajurú, rio Pará (Figura 4, Tabela 2).

Tabela 2. Sítios de coleta e coordenadas geográficas das amostras de *Prochilodus costatus* e *Prochilodus argenteus* na bacia do rio Pará. Todos os peixes foram coletados no período de 2006 a 2007.

Espécie	Sítios de coleta	Coordenadas geográficas
<i>P. costatus</i>	Jusante da UHE Gafanhoto (DGF, I)	20° 05' 58" S - 44° 50' 56" W
<i>P. costatus</i>	Trecho do rio entre as UHEs Gafanhoto e Cajuru (DCA, II)	20° 14' 17" S - 44° 45' 13" W
<i>P. costatus</i>	Montante UHE Cajurú (UCA, III)	20° 15' 05" S - 44° 45' 16" W

Tamanho amostral: 45

### 3.1.3) Rio Grande

Foram coletados no rio Grande, Minas Gerais, 364 exemplares adultos de *P. lineatus* a jusante da UHE Porto Colombia (Figura 16) para renovação de estoque de matrizes de reprodutores utilizados em programas de repovoamentos da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG) (Figura 17), pertencente à CEMIG e 88 tecidos de nadadeiras caudais de exemplares adultos da espécie *Prochilodus lineatus* a montante da UHE Volta Grande e em seu reservatório (Figura 18) e o respectivo material fixado em Etanol 70% (P.A.). A coleta foi realizada durante duas campanhas (Outubro 2011 e Janeiro de 2012) por nossa equipe em conjunto com a equipe da Estação Ambiental de Volta Grande, coordenada pela bióloga Alessandra Bedore.

Para a coleta dos peixes foi utilizada amostragem padronizada com redes de emalhar. São utilizados, em média, 200 metros de rede de emalhar de malha de 12 a 25 cm. Em todos os pontos estabelecidos, as redes permanecem na água por cerca de 12 horas, sendo armadas ao anoitecer e retiradas na manhã seguinte, por volta das 7:00 horas. As matrizes capturadas foram levadas para o caminhão de transporte (Figura 19) e transportados diretamente para a Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG) onde foram mantidas em tanques de piscicultura escavados.

Para o transporte das matrizes, os peixes foram armazenados em tanques rede instalados nas margens do reservatório (Figura 20) ou transferidos diretamente para caminhão de transporte que promove o deslocamento até a Estação Ambiental de Volta Grande. As matrizes foram transportadas por meio de um caminhão da marca Volkswagen, modelo 17180, equipado com cinco tanques de fibra de vidro, medindo 1,9 x 0,9 x 0,9 m cada, com capacidade de armazenamento de 1,54 m<sup>3</sup> de água, o que totaliza 7,7 m<sup>3</sup> (7.700 litros) de água. O caminhão possui sistema de injeção de oxigênio nos tanques por meio de bomba compressora e cilindro de oxigênio.



Figura 16: Coleta de Matrizes de *P. lineatus*: jusante da UHE Porto Colombia, rio Grande, MG. Foto: Tatiana Moura Barroca.



Figura 17: Estação Ambiental de Volta Grande, localizada em Conceição das Alagoas, no Triângulo Mineiro. É a principal estação de piscicultura da CEMIG, responsável pela produção de alevinos de espécies das Bacias do rio Grande e Paranaíba. Possui tanques para a manutenção de reprodutores e alevinos, laboratórios e técnicos dedicados à reprodução. Foto: Tatiana Moura Barroca.



Figura 18: Coleta de exemplares de *P. lineatus*: montante da UHE Volta Grande, rio Grande, MG. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Alessandra Gomes Bedore.



Figura 19: Transferência das matrizes de *P. lineatus* capturadas a jusante da UHE Porto Colômbia, rio Grande, MG para o carro de transporte da CEMIG que promove o deslocamento até a Estação Ambiental de Volta Grande, MG. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Tatiana Moura Barroca.



Figura 20: Armazenamento dos peixes em tanques rede instalados nas margens do reservatório de Porto Colômbia, rio Grande, MG. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Tatiana Moura Barroca.

### **3.2) Biblioteca genômica:**

A biblioteca de DNA genômico do peixe *Prochilodus lineatus*, construída no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares/UFMG, utilizou o vetor pUC 18 no sítio da enzima de restrição BamH1 (cliva GGATCC, presente apenas no Sítio Múltiplo de Clonagem). O DNA genômico deste peixe foi digerido com a enzima de restrição Sal3A1 (cliva GATC) e submetido à eletroforese em gel de agarose, onde foram selecionados fragmentos de DNA maiores que 400pb. Esse material foi ligado ao vetor pUC 18, digerido previamente com BamH1 (Yazbeck 2007). Foi realizada a transformação de bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli* da linhagem Topo 10 com o vetor pUC 18 acima mencionado e, em seguida, a seleção de colônias que continham uma inserção de DNA genômico da espécie alvo no vetor como descrito em Paiva (2007) e Yazbeck (2007). A varredura da biblioteca foi feita com o uso de sondas de oligonucleotídeos marcadas com fósforo radioativo. Foram isolados setenta e um clones positivos encontrados na varredura da biblioteca genômica (Barroca 2009).

A varredura da biblioteca foi feita com o uso de sondas de oligonucleotídeos marcadas com fósforo radioativo. Foram utilizados os seguintes temas de repetição: GATA, TATC, GACA, GGAT, TATT, TACT, CGGA, GTCA, CCGT, GAGG, GATT, CATG, CCAG, CATG, CCAG, CTTG, CAGC, TATG, TAGT, AAGT, AAGT, CAT, CAC, GTA, GAA, AAT, CTT, CAC, CCG, CAG, CA, CT e TA (Yazbeck, 2007).

### **3.3) Isolamento de marcadores moleculares para *Prochilodus* spp.**

Os clones positivos de *P. lineatus* selecionados na triagem com sondas radioativas foram inseridos em bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes através da técnica de eletrotransformação, em seguida foi realizada a extração de plasmídeos por lise alcalina e por último foram feitos seqüenciamentos e análises dos dados buscando novos marcadores moleculares para o gênero (Barroca 2009).

Os clones foram precipitados com 10% do volume de acetato de sódio 3 Molar e 2 vezes o volume de etanol 70% para a retirada do excesso de sal existente nos mesmos. Depois foram centrifugados por 10 minutos, a 16000 g, a 4 °C. Retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se 200 µL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente durante 5 min., a 16000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e acrescentou-se novamente 200 µL de etanol 70%. Foi realizada mais uma centrifugação durante 4 minutos, a 16000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi retirado do tubo contendo o clone e o

mesmo secou a temperatura ambiente. Os plasmídeos foram ressuspensos em 6 µL de água bidestilada (Phoneutria, BH, MG) e então preparados para a eletroporação. As bactérias eletrocompetentes utilizadas na eletroporação foram as *Escherichia coli* da linhagem Topo 10, lavadas em glicerol 10% e armazenadas a -80 °C (Phoneutria, BH, MG). Incubou-se o plasmídeo com 100 µL de *Escherichia coli* e a solução de plasmídeo e bactéria foi então transferida para uma cubeta e submetida a um choque de 2 kVa (quilovolt-ampères) no eletroporador de pulso Micropulser da Bio-Rad. Após o choque foi adicionado 1 mL de solução SOC (Phoneutria, BH, MG) (20 mM de MgSO<sub>4</sub>, 20 mM de glicose) e após a homogeneização incubou-se a 37 °C por 1 hora.

A solução foi transferida para outro tubo de 15 mL contendo meio 2XYT (5 g de NaCl, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, água destilada q.s.p. 1 L, pH 7.5 e ampicilina (1 µL de ampicilina/ mL de meio), ficando a temperatura ambiente por cerca de 18 horas. O plasmídeo pUC 18 (Figura 21) confere resistência à ampicilina, então utilizou-se esse antibiótico para selecionar apenas as bactérias que tivessem o plasmídeo.

Após 18 horas, 100 a 200 µL de meio foram plaqueados em meio LB ágar (10 g de NaCl, 10 g de bactotripton, 5 g de extrato de levedura, 20 g de ágar, água destilada q.s.p. 1 L, pH 7,5) com ampicilina (1 µL de ampicilina/mL de meio). Alguns dos clones selecionados pela sonda radioativa não estavam em tubos individualizados, tinha-se tubos com 2 ou 3 diferentes clones, então, na tentativa de que todos os clones fossem selecionados, coletou-se um grande número de colônias. As colônias foram então incubadas em 10 ml de meio 2XYT com ampicilina a 37 °C com agitação por 18 horas para garantir o crescimento das bactérias.

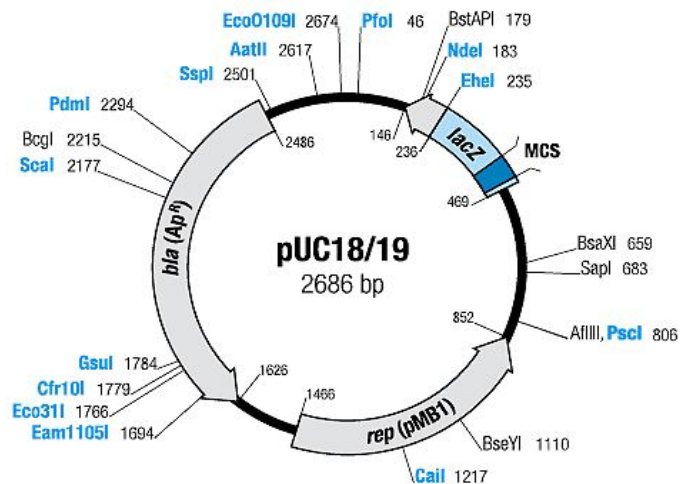


Figura 21: Mapa do vetor pUC 18, evidenciando o gene de resistência à ampicilina (bla (Apr)).

Os tubos que continham as bactérias que estavam sendo incubadas a 37 °C por 18 horas em meio 2XYT com ampicilina foram centrifugados por 5 minutos a 10000 g e o sobrenadante descartado. Foram então adicionados 300  $\mu$ L de Solução I (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0), ressuspendendo o *pellet*, e então, adicionou-se 300  $\mu$ L de Solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%). Logo em seguida, foram adicionados 300  $\mu$ L de Solução III (acetato de potássio 3 M, 11,5% ácido acético glacial) e após incubação em gelo por 5 minutos, os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a 16000 g. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e um volume de 600  $\mu$ L de isopropanol foi adicionado, agitando-os esporadicamente por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante após centrifugação a 16000 g por 10 minutos. O precipitado foi lavado em 1 mL de etanol 70%, centrifugando-o a 16000 g por 5 minutos, e seco a temperatura ambiente, após a eliminação do excesso de etanol.

Após a extração por lise alcalina, o plasmídeo foi ressuspendido em 50  $\mu$ L de RNase 10 ug/ $\mu$ L, deixando-a agir por 1 hora a 37 °C para ocorrer a eliminação do RNA. Aplicou-se 1  $\mu$ L da solução em um gel de agarose 1% onde a coloração foi realizada com Brometo de Etídeo para verificar se as bactérias que haviam sido coletadas possuíam plasmídeos diferentes, selecionar quais clones seriam seqüenciados visualizando a qualidade das bandas no gel e quantificá-los através da intensidade de bandas vista no gel de agarose.

Para a realização da reação de seqüenciamento utilizou-se 200 ng de plasmídeo, 0,3  $\mu$ L de BigDye Terminator v3.1 Cycle da Applied Biosystems, 1,6 pmol de um iniciador do plasmídeo pUC18 (Figura 21): M13 direto 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' ou reverso 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3' (para fazer o consenso), 1,77  $\mu$ L de Tampão de seqüenciamento BigDye Terminator v3.1 da *Applied Biosystems* e água suficiente para 10  $\mu$ L. Essa reação foi, então, levada para o termociclador onde foi utilizado o programa padronizado para o seqüenciador 3130 *Genetic Analyzer* da *Applied Biosystems*:

96 °C por 2 minutos	}	44 ciclos
96 °C por 30 segundos		
Rampa 1 °C/seg.		
50 °C por 15 segundos		
Rampa 1 °C/seg.		
60 °C por 4 minutos		
Mantém 4 °C		

O produto de amplificação foi então precipitado com 40 µL de isopropanol 65%, deixado 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 16000 g por 25 minutos a 25 °C. O isopropanol foi então removido e lavou-se o pellet com 300 µL de etanol 60%. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16000 g por 5 minutos e deixados para secar a temperatura ambiente, após a eliminação do excesso de etanol para então serem guardados no freezer -20 °C. Esse precipitado era, então, encaminhado para o seqüenciamento no *ABI 3130 Genetic Analyzer* do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares do ICB/UFMG.

Os plasmídeos foram seqüenciados em ambas as direções. As seqüências resultantes foram analisadas por meio dos programas Phred/Phrap/Consed (Ewin e Green 1998; Gordon et al. 1998) para obtenção de seqüências consenso. A região da seqüência que correspondia à do plasmídeo de clonagem pUC18 era excluída das análises. Para isso, o programa VecScreen (NCBI- *National Center for Biotechnology Information*, disponível online em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acesso: fevereiro de 2010) foi utilizado.

Oito seqüências que possuíam marcadores moleculares foram selecionadas para o desenho dos iniciadores. O *locus* do marcador é margeado por uma seqüência única de bases. Se a seqüência flanqueadora se torna conhecida, iniciadores podem ser sintetizados de modo a complementar essas seqüências, de tal forma que o *locus* do marcador pode ser amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Para desenho dos iniciadores, foi utilizado o programa Primer3 v. 0.4.0 (Rozen e Skaletsky 2000) de onde foram selecionados aqueles que mais se enquadravam com os nossos objetivos que eram aproximadamente 60% de bases C e G e temperatura média de anelamento entre 54 °C e 60 °C, para que não ocorresse a formação de bandas inespecíficas. Para todos os programas utilizados, os resultados obtidos foram criteriosamente analisados para a verificação de possíveis erros dos mesmos.

### **3.4) Estudo genético das matrizes da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG), Minas Gerais: reprodução induzida e marcação com microchip**

Foram realizadas reproduções induzidas de *Prochilodus lineatus* na EAVG na safra de 2010/2011. As matrizes selecionadas para reprodução da safra de 2010/2011 foram marcadas pela introdução de um microchip (Figura 28). O número do chip acompanha uma ou mais amostras biológicas da mesma matriz que foram levadas para o laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares para estocagem, extração de DNA e genotipagem.



### **3.5) Extração de DNA Genômico e organização do banco de DNA de peixes do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares - UFMG:**

O DNA genômico de indivíduos de *Prochilodus* spp. coletados nos rios Paraopeba, Pará e Grande foi extraído de um pedaço de 1cm<sup>2</sup> de nadadeira através de digestão com Proteinase K a 37 °C, durante a noite, seguido por extração padrão com fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.* 2001).

Um pequeno pedaço de nadadeira foi macerado em gelo seco, utilizando-se graal e pistilo. Adicionou-se no próprio graal 500 µL de TEN 9 (50 mM Tris-HCl, pH 9, 100 mM EDTA, 200 mM NaCl) e 2,5 µL de RNase (100 mg/ml) e em seguida, transferiu-se a solução para um tubo de 15 mL. O tubo foi agitado suavemente por inversão durante 10-30 minutos, até formar uma mistura homogênea. Adicionou-se 30 µL de SDS 20% e o tubo foi agitado novamente. Um volume de 30 µL de proteinase K (10mg/ml) foi adicionado, homogeneizando o conteúdo do tubo que, em seguida, foi deixado por aproximadamente 14 horas a 37 °C.

No outro dia, adicionou-se 1 volume de fenol/clorofórmio, agitando suavemente por 1 hora. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3000 g e a interface foi retirada e lavada com clorofórmio por 20 minutos. Quando necessário, a lavagem com clorofórmio foi repetida para eliminar completamente o fenol da amostra. Foi acrescentado então, 1/5 do volume de acetato de amônio 10 M e 1 volume de isopropanol. O tubo foi invertido gentilmente. O DNA foi retirado e transferido para outro tubo utilizando-se uma pipeta *Pasteur* selada. Em seguida, ele foi lavado com 1 mL de etanol 70% por 1 hora. O DNA foi tirado do álcool e deixado secar a temperatura ambiente. Em seguida, o DNA foi dissolvido com 20 µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM de EDTA) para posterior amplificação.

O DNA desses indivíduos foi organizado em um banco de DNA de peixes criado no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares/ UFMG (Figura 22) onde se tem as gavetas destinadas a cada projeto devidamente numeradas, o mapa da gaveta devidamente catalogado contendo a identificação de cada amostra coletada e de seu DNA extraído.



Figura 22: Banco de amostras de DNA de peixes do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares/ UFMG. Todas as 3.795 amostras de nadadeiras e fígado de 9 espécies de peixes (*Prochilodus costatus*, *P. argenteus*, *P. lineatus*, *Leporinus elongotus*, *L. friderici*, *Brycon orbignyanos*, *Piractus mesopotamicus*, *Salminus maxiosus*, *S. franciscanus*) provenientes das Bacias dos rios São Francisco e Paraná já estão catalogadas e armazenadas em suas gavetas assim como seu DNA extraído.

### 3.6) Amplificação e análise do *locus* 2V35:

O marcador 2V35 foi amplificado a partir de todos os 252 espécimes através da *Nested* PCR, utilizando-se os seguintes iniciadores: F1 5'-TAA TGA TTC TCT TTG CTT GTG TC-3', R1 5'-GCA GAC CCC TCA GCA C-3', F2 5'-TCT TTG CTT GTG TCT TG-3' e R2 5'-AAG GCC TGA AAT ACA GTG CA-3'. A reação de *Nested* PCR consiste em realizar duas reações de PCR consecutivas, onde a segunda PCR é realizada com o produto de outra PCR, sendo a primeira realizada com iniciadores mais externos do que a segunda, otimizando assim os resultados obtidos.

As reações de *Nested* PCR tinham um volume final de 25  $\mu$ L, contendo 20-50 ng de DNA genômico (primeiro *round*) e 0,5 ng de produto de PCR (segundo *round*), 5 pM de cada iniciador (F1/R1 primeiro *round* e F2/R2 segundo *round*) e um pré-mix contendo tampão IVB, dNTP's e Taq polimerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços, Belo Horizonte, Brasil).

O primeiro *round* tinha as seguintes condições de ciclagem: uma denaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, temperatura de anelamento dos iniciadores a 54°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 40 segundos, terminando com um passo de extensão final a 72°C durante 5 minutos. O segundo *round* teve condições cíclicas semelhantes, exceto que a temperatura de anelamento dos iniciadores foi de 51°C. Os produtos de PCR (8 µL) foram visualizados em gel de agarose a 2% e selecionados para o seqüenciamento direto.

O produto da PCR foi purificado em coluna de Sephacryll S-400, para a eliminação de *primers* e produtos inespecíficos amplificados menores que 400 pares de base e obtenção de DNA de alta qualidade para o seqüenciamento direto dos produtos obtidos.

Os produtos de PCR selecionados foram seqüenciados bidirecionalmente, utilizando-se os iniciadores F2 e R2, e o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA) seguindo o protocolo do fabricante, utilizando-se o *ABI 3130 Genetic Analyzer* do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares do ICB/UFMG.

### **3.7) Subclonagem do produto de *Nested* PCR em plasmídeo PCR 2.1 TOPO *Invitrogen*:**

Para a subclonagem dos indivíduos heterozigotos, os produtos da *Nested* PCR foram quantificados em gel de agarose 2%.

Para a ligação ao vetor utilizou-se 10 ng de produto de *Nested* PCR, 50 ng do vetor pCR 2.1 (Figura 23), 1 µL de tampão de ligação 10x, 4 unidades de T4 ligase e água estéril suficiente para 10 µL de reação e incubação por 16 horas a 14 °C. O plasmídeo foi precipitado utilizando-se acetato de sódio 3 M pH 5,2 e etanol 100%, deixando-o a uma temperatura de -80 °C por 20 minutos. Em seguida, centrifugou-se o plasmídeo a 16000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado. Lavou-se o pellet acrescentando 200 µL de etanol 70%, centrifugando por mais 5 minutos a 16000 g, retirando o sobrenadante, acrescentando novamente 200 µL de etanol 70%, centrifugando por mais 4 minutos a 16000 g, retirando o sobrenadante e deixando a temperatura ambiente até todo o etanol evaporar. Após esse procedimento, o plasmídeo encontrava-se pronto para a transformação.

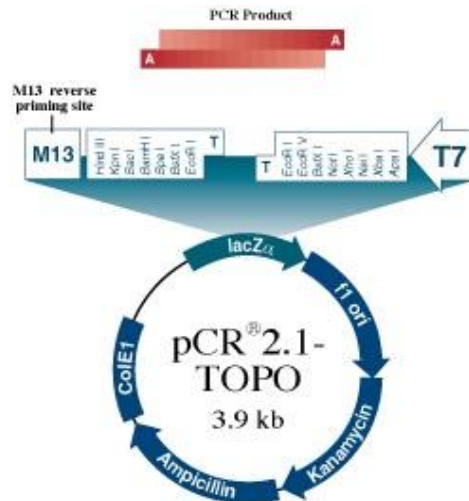


Figura 23: Mapa do vetor pCR 2.1 Topo evidenciando o sítio múltiplo de clonagem dentro do gene repórter lacZ e os genes que conferem resistência aos antibióticos ampicilina e kanamicina.

### 3.8) Transformação dos plasmídeos PCR 2.1 TOPO (*Invitrogen*) em bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes:

Após a subclonagem, os plasmídeos eram incubados com 100 µL de bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli*, linhagem XL1 Blue (Phoneutria, BH, MG) por 1 minuto no gelo e a transformação realizada. Para a seleção de bactérias que continham o plasmídeo, após a transformação plaqueou-se as mesmas em meio LB ágar, com ampicilina (1 µL de ampicilina/ mL de meio) e kanamicina (1 µL de kanamicina/ mL de meio). Após incubação das placas por 18 horas a 37 °C coletou-se as colônias que cresceram, pois essas possuíam o plasmídeo PCR 2.1 TOPO que as tornavam resistentes aos antibióticos. As colônias foram incubadas em 10 mL de meio 2XYT com ampicilina e kanamicina a 37 °C com agitação por cerca de 18 horas para que as bactérias multiplicassem.

### 3.9) Extração dos plasmídeos PCR 2.1 TOPO (*Invitrogen*) por lise alcalina:

Os tubos que continham as bactérias que estavam sendo incubadas tiveram seus plasmídeos extraídos conforme o descrito em Barroca (2009). Após a extração do plasmídeo por lise alcalina, o mesmo foi ressuspensionado em 50 µL de RNase (10 mg/ml-estoque), 2 µL/ mL de TE (10 mM pH8,0 Tris-HCl/0.1 mM pH 8,0 EDTA), deixando agir por 1 dia a 37 °C, e meio dia a temperatura ambiente para a eliminação do RNA. Logo após, fez-se a purificação com fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.* 2001)

e em seguida o plasmídeo foi ressuspendido em 20 µL de TE. Foi aplicado 1 µL da solução em um gel de agarose 0,8% com coloração em Brometo de Etídeo para quantificar o plasmídeo que foi então seqüenciado.

### **3.10) Análise de seqüenciamento:**

Após o seqüenciamento, foram realizadas análises para confirmar a qualidade das seqüências geradas utilizando-se o programa *Sequencing Analyses* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA).

No caso dos indivíduos submetidoa à técnica de subclonagem, foram feitas análises para confirmar a existência do inserto contendo a seqüência do marcador molecular 2V35 no vetor pCR 2.1 TOPO.

Tanto para os sequenciamento realizados com o iniciador F2 quanto para os com o M13R (indivíduos subclonados), as sequencias se apresentaram no sentido 3'-5'. Para se obter a fita reversa complementar, foi utilizado o programa MEGA versão 5 (*Molecular Evolutionary Genetics Analyses*) (Tamura *et al.* 2011).

No caso das análises dos indivíduos subclonados, a região da seqüência que correspondia à do vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO era excluída das análises. Para isso, o programa *VecScreen* (NCBI- *National Center for Biotechnology Information*, disponível *on line* em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/vecScreen/VecScreen.html>. Último acesso: Dezembro 2011.

### **3.11) Análise estatística dos dados:**

O programa Arlequin 3.5.1 (Excoffier *et al.* 1992) foi utilizado para medir a variação genética a nível intra e inter-populacional utilizando-se índices de diversidade como diversidade gênica, diversidade nucleotídica, número de transversões, transições e indels observados e número de haplótipos compartilhados entre as populações.

A estrutura genética das amostras foi avaliada através de análises hierárquicas de variância molecular (AMOVA) (Excoffier & Lischer 2010), que foram conduzidas pela imposição de cinco *clusters* diferentes e um grupo populacional para as amostras do rio Paraopeba, três *clusters* diferentes e um grupo populacional para as amostras do rio Pará e quatro *clusters* diferentes e um grupo populacional para a análise intra-específica. A fonte de variação foi calculada a partir do particionamento da variância molecular entre e dentro de populações. O  $F_{st}$  de Wright (Wright 1951) foi utilizado para a análise de diferenciação populacional.

O isolamento por distância foi avaliado para as populações dos rios Paraopeba e Pará, testando-se a correlação entre matrizes de distância genética e geográfica, através do Teste de Mantel (Mantel 1967), utilizando-se 1.000 permutações e transformações logarítmicas de ambas as medidas de distância com o programa *Alleles in Space* (Miller 2005).

Análises filogenéticas das amostras dos rios Pará e Grande foram conduzidas utilizando-se o programa MEGA versão 5 (Tamura *et al.* 2011). A árvore filogenética foi construída usando o algoritmo *Neighbour-joining* (Saitou & Nei 1987), utilizando-se o método *p* de distância (Nei & Kumar 2000) e assumindo taxas evolutivas uniformes. A confiança da topologia resultante foi estimada por *bootstrapping* (10.000 replicações).

#### **4) RESULTADOS**

##### **4.1) Seqüenciamento e análise de clones positivos:**

Na dissertação desenvolvida por Barroca (2009), um total de 71 clones foi seqüenciado (Tabela 3), sendo que 19 (26%) apresentaram pelo menos uma seqüência repetitiva, 3 destes 19 clones foram selecionados para o desenho dos iniciadores (Clone 2M3, Clone 2v35 e Clone 2X7), sendo que estes marcadores se enquadram na categoria de *Complex hypervariable repeats*. Neste trabalho de doutorado, mais 5 clones foram selecionados para o desenho dos iniciadores (Clone 2T21, Clone 2W20, Clone 2W31, Clone 2W34 e Clone 3C10). Os iniciadores internos e externos foram desenhados utilizando-se o programa *Primer3* v. 0.4.0 (Rozen e Skaletsky 2000).

A temperatura de anelamento de cada iniciador foi calculada pelo programa *Primer3* v.0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000) e posteriormente testada na PCR para ajuste preciso a ser utilizado na amplificação do DNA genômico. A Figura 24 mostra as siglas de identificação dos clones padronizados neste doutorado, os temas de repetição dos mesmos e suas seqüências.

Tabela 3: Clones de *Prochilodus* spp. Isolados a partir da biblioteca genômica do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares - UFMG. Primeira coluna: clones utilizados para eletrotransformação, segunda coluna: identificação do clone, terceira coluna: indicação do número de seqüenciamentos realizados por clone.

Clone	Identificação	Seqüenciamento
1	2M3	2
2	2O14	2
3	2O20	2
4	2O30	2
5	2P19	2
6	2P22	2
7	2R25	2
8	2R31	2
9	2S3	2
10	2S20	2
11	2S35	2
12	2T10	2
13	2T14	2
14	2T21	2
15	2U12	2
16	2U14	2
17	2u32	2
18	2V26	2
19	2V35	2
20	2X7	2
21	2x27	2
22	2Z2	2
23	2Z11	2
24	3A5	3
25	3A19	3
26	3A26	3
27	3B18	3
28	3B26	3
29	3C4	3
30	3C10	3
31	3C18	3
32	3C27	3
33	3D10	3
34	3D22	3
35	3E9	3

Clone	Identificação	Seqüenciamento
36	3,00E+27	3
37	3,00E+32	3
38	3F5	3
39	3M29	3
40	5N34	3
41	5O10	3
42	5O32	3
43	5P6	3
44	5Q11	3
45	5Q18	3
46	5R13	3
47	5S7	3
48	5S18	3
49	5S31	3
50	5T22	3
51	5T25	3
52	5T28	3
53	5U29	3
54	5V34	3
55	5W11	3
56	5W18	3
57	5W27	3
58	5Y9	3
59	5Y22	3
60	5Y30	3
61	5Y33	3
62	5Z3	3
63	6A10	3
64	6A20	3
65	6A33	3
66	6B9	3
67	6B30	3
68	6C30	3
69	6D11	3
70	6D16	3
71	6E6	3

A) Clone 2M3 (CA)<sub>n</sub>

5'CACACACACACACACACACACACACACACACACGACACGCACACTCACACTCA  
CACTCACACACGCACACGCACACGCACACGCACATGCACACACACACACGCACA  
CACACACACGCACACACACGCGCACACAAACGTACACGCACACATACACACACAC  
GCACACGCACACGGACACTCACACACGCAAACACACACGCACACGCACACGCAC  
ATGCACACACACACACACACACACACACACACACACGCGCACACGCACACATACA  
CACACGCACACTCACACACGCACATGCACACACACGCGCGCACGCACACACGCG  
CACACGCACACACA3'

B) Clone 2T21 (TC)<sub>14</sub>(TC)<sub>17</sub>

5'TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC  
TCTCTCTC3'

C) Clone2v35 (CT)<sub>n</sub>

5'CTCTCTCTCTCTTTCTCTTTGTCTCTCCCTTTGTCCCACCTTCCCTTCTCACTCTA  
TCATTTCTCTGCCTTTTCATCTTTGTCACTTTTTCTCCAACGCTTCTCTCTCTCTCTTT  
TTTCTCTTTCTTTTTTTAACCTCCCTCTGTGCCATTTTCTGATGTCACCTCTTTTTCTCT  
CTCTCCATGTCTCTACCTCTTTTTCTCTTCCCTCTCTCCCCATATTGCCCTTTTCAC  
TTTCTCCCTCTGTCTCTCTCTCCATCTATTTCTTATTCTGCGTCTTTCTTTCCAC  
TCACCGTCTTTCTTTTCTGTCTCTTTCTCCATGTCTCTCCCTCTTTCTCTCTTGTG  
TCCTTTTTTCTGTCAGCCTTTGTTTCATCACCTGCAAACCTCTCATGCTGTCCCTCTGC  
CGTTTCT3'

D) Clone 2X7 (GA)<sub>n</sub> (GAAA)<sub>n</sub>

5'GAGAGAGAGAGAGGAGAGAGAGAGAAAGAAAAAGAGAGAAAGAGAGAGAGAAA  
GAGAAAGAAGGGGGAGGAGGGGAAGGAAGACAAAAGGAAGAGGGCAGAAAGA  
AAGACAGAAGGAAAGACAGAAAGAAAGAAAAAACAAAAACACAGAAAGAACAC  
ACAAAAGAAGAAATAAGAGACAGAAAGAGAGAAAAAAATGAAAAATAACAACCC  
AGAAAGAACACTTAAAGAAGCAAGGAGGCCAGAGAAAAACAGACATGAAGAAAAG  
ACAAATGAAATAAAGAAAAATGAATTGAAAGGAAAAAGACAAAAGAAAGAAACA  
GAAAGAAAGAACGAAAGAAAGAACGAAAGAACGAAAGAAAGAACGAAAGAAAGAA  
AGAACAAAAGAAAGAACGAAAGAAAGAAAGAAAGAACGAAAGAAAGAAAGAAAGA  
ACGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAC



GAAAGAAAGAAAGAAAAGGAAGAAAGAACAAAAGAACGAAAGAAAGAACAAAAGA  
ACGAAAGTAAATGAAGAAAAAGAAAGAGAAAGAGGTAGAAGAAGGAAATAGAAAA  
AGAAAAGAAAGAAAGTAAGTAAAGGGAGATAAAGAAAGAGAAAGAGGTAGAAGAA  
GGAAATTTAAAAAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGTAAAGGAAGAAAAAGAAAGAG  
AAAGAGGTAGAAGAAGGAAATAGAAAAGGAAAAGAAAAGAAAAGCATTAAAGAAA  
GAAACAAAGAAAAATGAAGGACGAAAGAAACAAACAGAGAAAGAAAAATGAAGAA  
AGGAAGAAAGAAAGAAAGGAACAAA3'

E) Clone 2W20 (CA)<sub>11</sub>TA(CA)<sub>3</sub>TA(CA)<sub>12</sub>

5'CACACACACACACACACACACATACACACATACACACACACACACACACACACA  
CAGGCA3'

F) Clone 2W31 (TC)<sub>9</sub>AC(TC)<sub>11</sub>

5'TCTCTCTCTCTCTCTCTCACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT3'

G) Clone 2W34 (TC)<sub>8</sub>TT(TC)<sub>1</sub>TT(TC)<sub>2</sub> TTG(CA)<sub>14</sub>(TA)<sub>25</sub>

5'TCTCTCTCTCTCTCTCTTTCTTTCTTTGACACACACACACACACACACACACA  
CATACACACAC  
ATCCACACACA 3'

H) Clone 3C10 (TG)<sub>16</sub>

5'TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG3'

Figura 24: Marcadores moleculares encontrados no seqüenciamento de clones do peixe *Prochilodus lineatus* cujas seqüências flanqueadoras foram selecionadas para desenho dos iniciadores internos e externos a serem utilizados em *Nested* PCR. Todas as seqüências apresentadas estão no sentido 5'-3'. As regiões dos marcadores moleculares estão grifadas. A) Clone 2M3, B) Clone 2T21, C) Clone 2v35, D) Clone 2X7, E) Clone 2W20, F) Clone 2W31, G) Clone 2W34, H) Clone 3C10.

#### **4.2) Estudo genético das matrizes da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG), Minas Gerais: reprodução induzida e marcação com microchip**

As seleções de reprodutores foram realizadas no período de dezembro de 2010 a fevereiro de 2011 nos tanques O6, F1 e J da EAVG. As matrizes, que manifestavam sinais de maturação sexual externo, como abaulamento ventral com maciez em fêmeas, seguidos da verificação de eliminação de pequena quantidade de sêmen ou de resultado positivo na canulação com retirada de ovos (Figuras 25 e 26), foram selecionadas e mandadas para a caixa de transporte.

Dentro das caixas de transporte os reprodutores selecionados eram pesados, marcados com lã colorida e anotados dados correspondentes ao sexo e peso. Posteriormente eram transportados para o laboratório, divididos nos aquários e separados por sexo.

Com a relação da marca correlacionada com o peso e o sexo dos reprodutores se promovia o cálculo da dosagem de hormônio a ser aplicado em cada reprodutor. Usualmente, no mesmo dia da seleção, as 11:00 H aplicava-se a primeira dosagem hormonal (Figura 27) e por volta das 23:00 H a segunda dosagem de hormônio (extrato bruto de hipófise de carpa). Após a aplicação da segunda dosagem os reprodutores eram separados em trios (2 machos e 1 fêmea) em cada aquário do laboratório.

No dia seguinte da aplicação hormonal, dos aquários que manifestaram resultado positivo de desova, eram transferidos cerca de 6000 mL de ovos hidratados para as incubadoras. Procurava-se realizar uma única transferência (incubadora) por aquário, mas eventualmente e de acordo com a disponibilidade do laboratório, poderia ser utilizada mais de uma incubadora por aquário. Isto geralmente era processado com os aquários que manifestaram os melhores resultados.

Após a transferência dos ovos hidratados para as incubadoras, realizava-se a marcação com microchip dos reprodutores (Figura 28), sempre se preocupando em correlacionar a marca recebida na seleção (lã colorida) com o número identificador do microchip, além é claro do número do próprio aquário ao qual se destinou o reprodutor. Assim se torna possível a visualização da marca do microchip do reprodutor utilizado na obtenção das pós-larvas de determinada incubadora.

Antes de transferir os reprodutores para as caixas de transporte foi coletado um pequeno fragmento da nadadeira caudal ou adiposa e feita a fixação em álcool 70% (Figura 29). Posteriormente à marcação genética e física, o peixe era levado para a caixa de transporte e transferido para o tanque de quarentena (O4).

Cerca de 9 horas depois da fertilização avaliava-se a taxa de fertilização de cada incubadora e aquário. Os resultados referentes a essa análise eram transferidos para as planilhas de controle e determinado a produção em número de pós-larvas da reprodução. A partir desses dados determinavam-se quais tanques iriam receber essas pós-larvas, sempre respeitando em média 200 pós-larvas por m<sup>3</sup>. As transferências das pós-larvas para os tanques só era realizada cerca de 3 a 4 dias após a eclosão.

Para se manter um devido controle em relação aos dados coletados convencionou-se:

- a) a marcação com microchip está sempre correlacionada com a marca utilizada na reprodução (fio de lã colorido) e com o aquário ao qual o espécime foi colocado.
- b) o fragmento de nadadeira coletado de cada exemplar recebia um número (geralmente de 1 a 24) e no caderno de campo anotou-se a qual número de microchip e a qual aquário pertencia esse fragmento.

Com isso procurava-se manter um histórico de cada casal, seus dados genéticos, sua marcação física e a correlação com as pós-larvas produzidas a partir de cada casal marcado. Todos os dados eram anotados no caderno de campo, incluindo a identificação do casal ou trio colocado em cada aquário (número do aquário), a marca física recebida por cada um dos constituintes do casal, a identificação de cada fragmento de nadadeira (a qual indivíduo pertencia), a incubadora que recebeu pós-larvas de cada casal, taxa de fertilização e produção de cada incubadora.

Nas safras de 2009/2010 e 2010/2011 foi marcado um total de 340 matrizes provenientes do rio Grande, coletadas a jusante da UHE Porto Colombia (Anexo 1). As amostras biológicas (nadadeira caudal ou adiposa) foram devidamente coletadas, armazenadas em etanol 70% e posteriormente enviadas para o Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares/UFMG para estocagem no banco de DNA.

Na safra de 2011/2012 foram marcadas um total de 155 matrizes provenientes do rio Grande, coletadas a jusante da UHE Porto Colombia (Anexo 1). As amostras biológicas (nadadeira caudal) foram devidamente coletadas, armazenadas em etanol 70% e posteriormente enviadas para o Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares/UFMG para estocagem no banco de DNA.



Figura 25: As matrizes que manifestavam sinais de maturação sexual externo, como fêmeas com abaulamento ventral com maciez foram selecionadas para reprodução. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Alessandra Gomes Bedore.



Figura 26: Verificação de maturação sexual de matrizes de *P. lineatus* na Estação Ambiental de Volta Grande, MG, através de canulação com retirada de sêmen. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Evanguedes Kalapothakis.



Figura 27: Aplicação da primeira dosagem hormonal (extrato bruto de hipófise de carpa) em Matriz de *P. lineatus*, no laboratório da Estação Ambiental de Volta Grande, MG. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Evanguedes Kalapothakis.



Figura 28: Introdução do microchip na musculatura dorsal direita de uma Matriz de *P. lineatus*, próximo a base da nadadeira dorsal. Foi realizada para todos os indivíduos a correlação da marca recebida na seleção (lã colorida) com o número identificador do microchip, além do número do próprio aquário ao qual se destinou o reprodutor. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Evanguedes Kalapothakis.

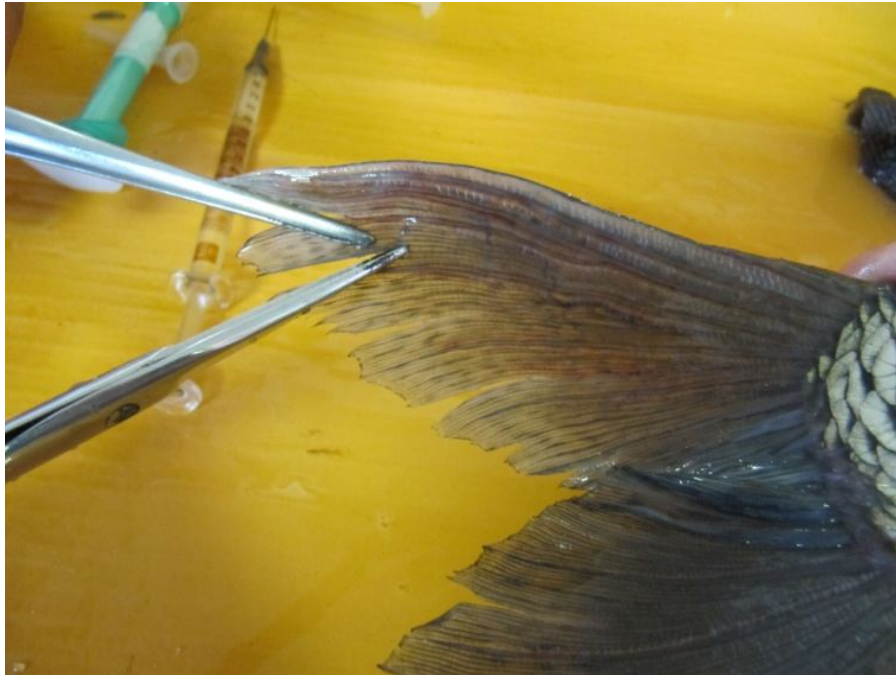


Figura 29: Retirada de amostra de tecido do lóbulo superior da nadadeira caudal de uma Matriz de *P. lineatus* para estocagem em etanol 70% e posterior catalogação no banco de dados do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares e extração de DNA. Trabalho desenvolvido em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG. Foto: Evanguedes Kalapothakis.

#### **4.3) Amplificação e análise do *locus* 2V35:**

O DNA genômico de 252 indivíduos de *Prochilodus* spp. coletados nos rios Paraopeba, Pará e Grande foi extraído de um pedaço de 1cm<sup>2</sup> de nadadeira através de digestão com Proteinase K a 37 °C, durante a noite, seguido por extração padrão com fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.* 2001).

A Figura 30 mostra exemplos de amplificação feitas com os iniciadores internos e 11 amostras de *P. lineatus* referentes às matrizes da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG). Os iniciadores resultaram em ampliações consideradas satisfatórias para a genotipagem. A quantidade de DNA utilizada para a reação de PCR varia de acordo com cada indivíduo e é calculada de acordo com a quantificação realizada em gel de agarose 0,8% do DNA genômico.

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram padronizadas de tal forma que se obtém uma quantidade suficiente de DNA de alta qualidade para o seqüenciamento. As 252 amostras de curimatã foram amplificadas com sucesso.

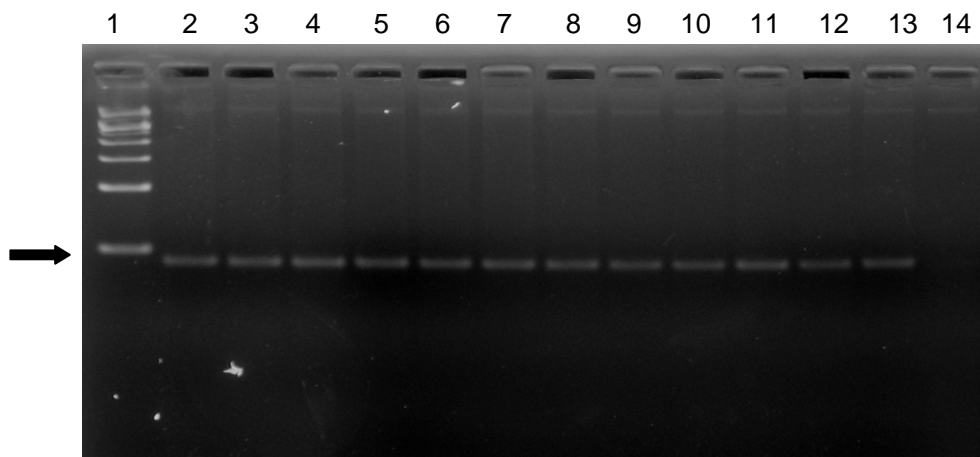


Figura 30: Gel de agarose 2% contendo o produto de amplificação da segunda etapa da *Nested* PCR, utilizando-se o tampão IV B. Canaleta 1: padrão de peso molecular 1 KB (Amresco). A seta indica o tamanho de 500 pb. Canaletas 2 a 12: produtos da *Nested* PCR das amostras referentes às matrizes da EAVG 110, 124, 129, 130, 132, 136, 139, 144, 161, 172 e 197. Canaleta 13: controle positivo da reação. Canaleta 14: controle negativo da reação.

#### 4.4) Subclonagem do produto da *Nested* PCR em plasmídeo pCR 2.1 TOPO *Invitrogen*:

A subclonagem em plasmídeo pCR 2.1 TOPO foi realizada com os produtos da *Nested* PCR de cada um dos indivíduos heterozigotos de *Prochilodus* spp. (52%) coletados nos rios Paraopeba, Pará e Grande. As amostras que apresentaram os melhores resultados, ou seja, bandas mais definidas e nítidas foram purificadas em coluna de Sephacryll 400, com o intuito de excluir fragmentos de amplificações inespecíficas. Após a reação de subclonagem, os plasmídeos foram eletrotransformados em *E. coli* XL1Blue. Foram selecionadas 10 colônias de cada indivíduo (Figura 31), os plasmídeos foram extraídos e então a PCR de colônia foi realizada para a verificação de inserto de DNA exógeno, ou seja, o marcador molecular 2V35, no vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO, como está demonstrada na Figura 32. Em seguida, os quatro melhores *amplicons* de cada exemplar foram selecionados para o seqüenciamento.

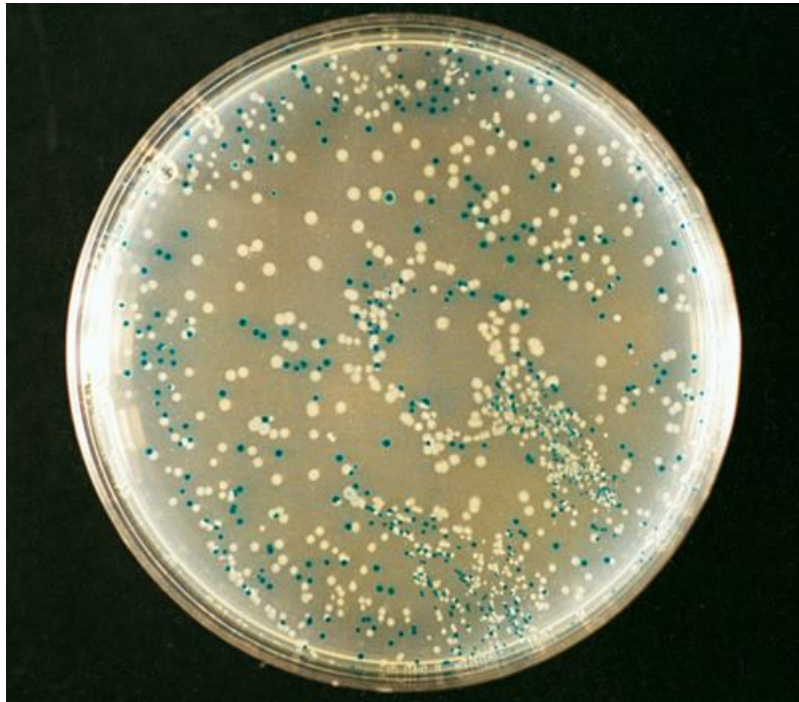


Figura 31: Placa de Petri contendo meio de cultura LB-Agar com ampicilina mostrando a alta eficiência da subclonagem do exemplar de *P. costatus* PcR40, coletado no rio Paraopeba, MG. As colônias brancas possuem o plasmídeo pCR 2.1 TOPO, resistente à ampicilina.

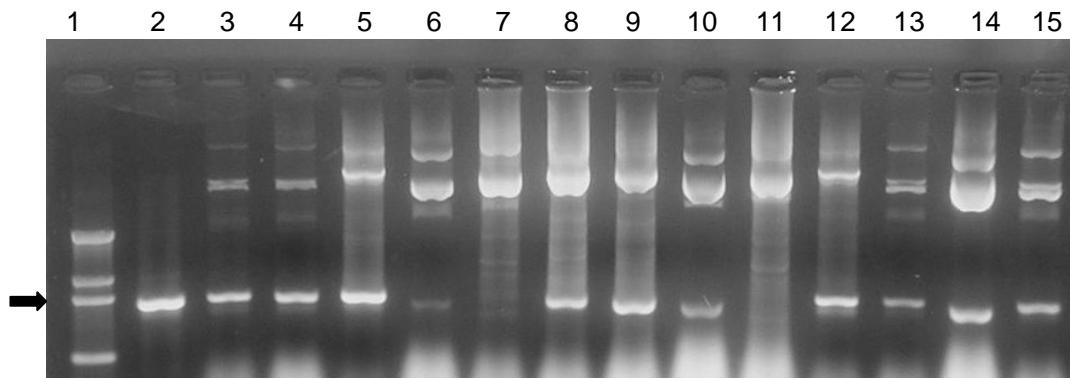


Figura 32: PCR de colônia antes da purificação com RNase do exemplar de *P. costatus* PcR40, coletado no rio Paraopeba, MG, em gel de agarose 1,5% para verificação de inserto de DNA exógeno no vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO. Canaleta 1: padrão de peso molecular 1.200pb. A seta indica o tamanho de 500 pb. Canaletas 2 a 15: produto de PCR de colônia do exemplar PcR40.



#### 4.5) Análise dos seqüenciamentos automáticos de DNA:

Foram feitas as análises de todas as seqüências geradas referentes às 252 amostras de *Prochilodus* spp.

Para cada indivíduo de *Prochilodus* spp. obteve-se sempre 04 seqüências de alta qualidade (Figura 33), totalizando 1.008 seqüências. Das 1.008, foram obtidas 252 seqüências consenso referentes ao marcador molecular 2V35. As seqüências foram então alinhadas pelo Clustal W, implementado no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007) e todo polimorfismo detectado era então conferido manualmente, voltando-se no eletroferograma que continha a seqüência em questão.

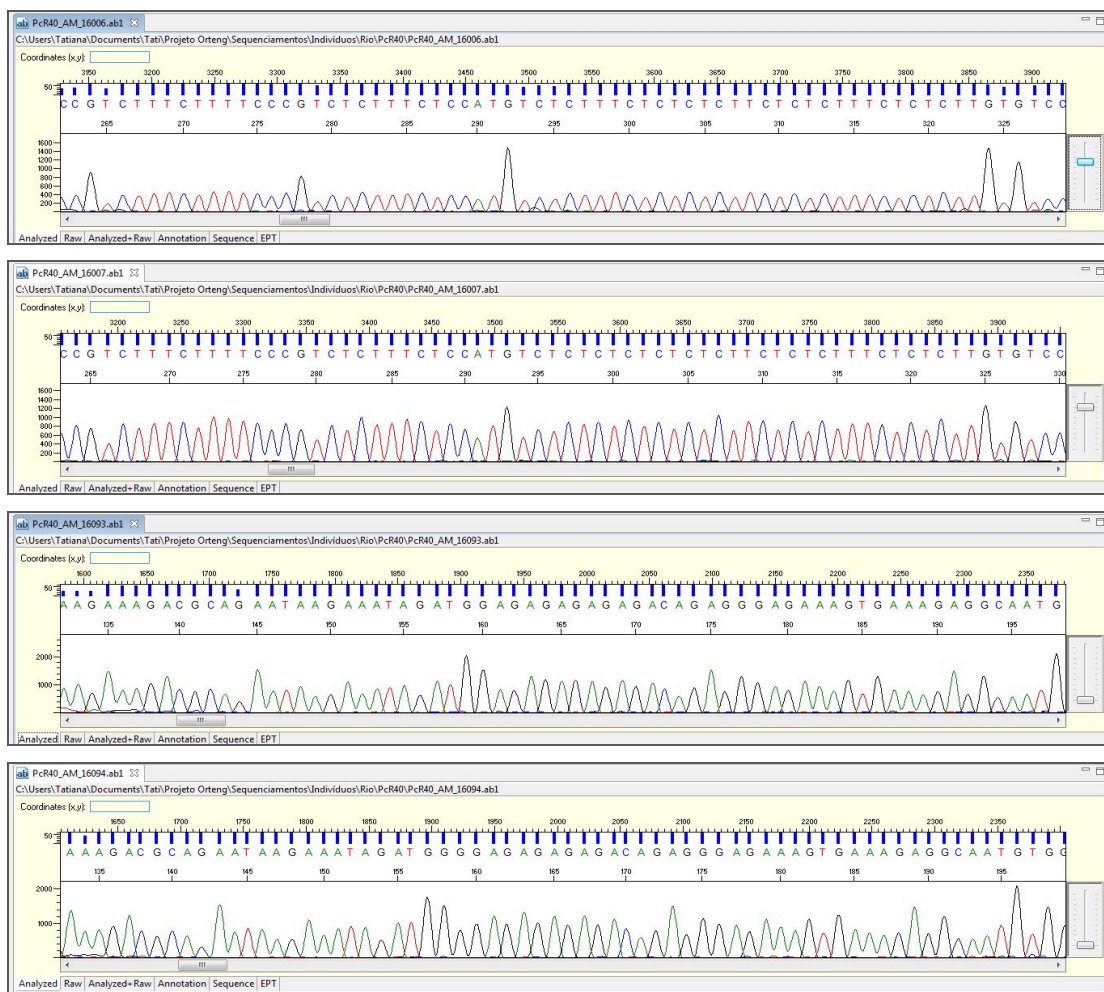


Figura 33: Exemplo de quatro eletroferogramas resultantes do seqüenciamento da região do marcador molecular 2V35 após subclonagem, do exemplar PcR40 de *P. costatus* coletado no rio Paraopeba, MG, mostrando alta qualidade dos picos.

#### **4.6) Análise estatística dos dados:**

##### **4.6.1) Amostras do rio Paraopeba:**

###### *4.6.1.1) Índices de diversidade:*

O marcador molecular 2V35 amplificou um fragmento com cerca de 459 pb em todas as 121 amostras (Figura 34). No total, 13-17 substituições e 14 indels resultaram em 35 haplótipos únicos de *P. costatus* (Tabela 4) e 4-20 substituições e 2-22 indels resultaram em 22 haplótipos únicos de *P. argenteus* (Tabela 5).

Para cada espécie, a maioria dos haplótipos foi encontrada somente em um único sítio de coleta e poucos haplótipos foram compartilhados. Para *P. costatus*, além do haplótipo 35 (Hap 35) que foi compartilhado entre todos os sítios, o sítio III compartilhou o Hap 9 com o sítio II, Hap 1 e Hap 2 com o sítio IV, e Hap 3 com os sítios II e IV. Para *P. argenteus*, os sítios II, III, IV e V compartilharam Hap 36 e Hap 37, e os sítios IV e V também compartilharam o Hap 46.

Transições, transversões e indels, além de todos os outros índices de diversidade apresentam-se na Tabela 6 para ambas as espécies. Em *P. costatus*, a diversidade genética foi maior (diversidade gênica = 0.888) na população do rio Paraopeba (sítio I). Em *P. argenteus*, a diversidade genética foi maior (diversidade gênica = 0.942) na população de Barra do rio (sítio V).

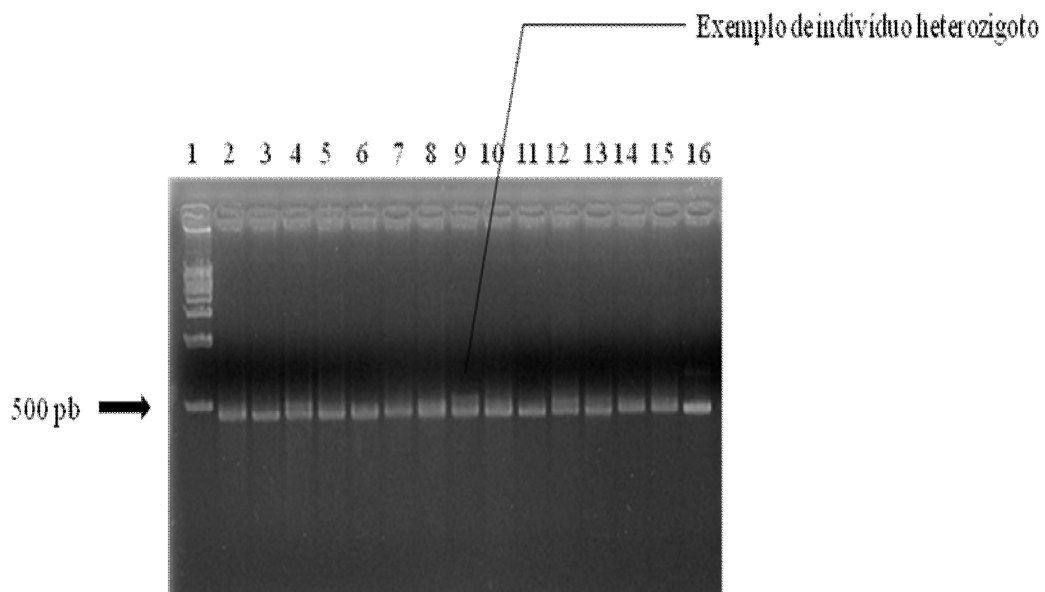


Figura 34: Resolução eletroforética da reação de Nested PCR em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, para amplificação de 14 amostras de *P. costatus* coletadas no rio Paraopeba, MG. Canaleta 1: Marcador de Peso Molecular 1KB (Amresco). Canaletas 2 a 15: amostras de *P. costatus* amplificadas. Canaleta 16: controle positivo da reação.

Tabela 4. Substituições e indels encontrados nos 35 haplótipos do marcador 2V35 para *P. costatus* coletados no rio Paraopeba.

Haplótipos	Sítios de coleta	Sítios polimórficos																																			
		48	78	101	102	103	104	105	106	114	130	133	146	199	232	269	323	344	345	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	376	405					
Hap1	III, IV	C	C	A	C	C	-	-	-	C	C	A	C	C	T	C	T	T	C	T	C	T	C	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T				
Hap2	III, IV	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
Hap3	II, III, IV	T	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
Hap4	V	T	T	C	T	T	T	T	T	G	T	T	T	.	.	T	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.				
Hap5	V	T	T	C	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
Hap6	V	T	T	C	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
Hap7	V	T	T	C	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
Hap8	II	T	T	C	T	T	T	T	T	.	T	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
Hap9	II, III	T	.	C	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
Hap10	II	T	.	C	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
Hap11	II	T	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap12	III	.	T	.	.	.	-	-	-	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
Hap13	III	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A		
Hap14	III	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap15	III	.	.	C	T	T	T	T	T	G	T	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap16	III	.	.	C	T	T	T	T	T	.	T	T	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap17	III	.	.	C	T	T	T	T	T	.	T	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap18	III	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
Hap19	III	T	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap20	III	.	.	C	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
Hap21	I	T	T	C	T	T	T	T	T	.	T	T	T	T	.	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	.			
Hap22	I	T	T	C	T	T	T	T	T	.	T	T	T	.	.	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	.		
Hap23	I	.	.	C	.	.	-	-	-	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
Hap24	I	.	.	C	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap25	I	.	.	C	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap26	I	.	.	C	T	T	T	T	T	T	T	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
Hap27	I	.	.	C	T	T	T	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap28	I	.	.	C	T	T	T	T	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap29	I	.	.	C	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
Hap30	I	.	.	C	.	.	-	-	-	T	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap31	I	.	.	C	T	T	T	T	T	.	T	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
Hap32	I	.	.	C	T	T	T	T	T	T	T	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap33	I	.	.	C	T	T	T	T	T	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap34	I	.	.	C	.	.	-	-	-	T	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	
Hap35	I, II, III, IV, V	T	T	C	T	T	T	T	T	G	T	T	T	.	.	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	.		

Tabela 5. Substituições e indels encontrados nos 22 haplótipos do marcador 2V35 para *P. argenteus* coletados no rio Paraopeba.

Haplótipos	Sítios de coleta	Sítios polimórficos																																																			
		52	60	61	105	106	114	128	129	147	168	169	200	233	238	248	290	298	324	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	357	367	376	377	378	391	392	398	399	400	401	411	413	422	423	424	425	427	428				
Hap1	I, II, IV, V	C	C	C	T	T	C	-	C	T	T	T	C	C	T	C	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	C	T	T	C	T	C	A	T	C	A	-	T	G	T	C	T	C				
Hap2	II, III, IV, V	.	.	.	.	.	G	-	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap3	IV	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap4	III, V	.	.	.	C	C	G	-	.	C	.	.	C	.	.	.	.	C	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	T	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap5	V	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
Hap6	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		
Hap7	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		
Hap8	V	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	-	T	C	-	.	.	.	.	T			
Hap9	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap10	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		
Hap11	II, V	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap12	V	.	.	.	.	G	-	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap13	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
Hap14	II	.	T	T	.	.	G	-	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap15	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap16	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap17	III	.	.	.	.	G	-	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
Hap18	I	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap19	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
Hap20	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
Hap21	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
Hap22	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C

Tabela 6. Índices de diversidade molecular de *P. costatus* e *P. argenteus* observados para os cinco sítios de coleta no rio Paraopeba.

	Locais de coleta				
	I (n=37)	II (n=9)	III (n=23)	IV (n=10)	V (n=10)
<b><i>P. costatus</i></b>					
Substituição	16	16	17	17	13
Transição	13	12	13	13	10
Transversão	3	4	4	4	3
Indels	14	14	14	14	14
h	15	6	14	4	5
H	0.8886	0.7582	0.8802	0.6158	0.7842
$\pi$	0.027909	0.031455	0.029261	0.032989	0.029549
	Locais de coleta				
	I (n=4)	II(n=10)	III (n=3)	IV (n=5)	V (n=10)
<b><i>P. argenteus</i></b>					
Substituição	6	7	9	4	20
Transição	5	5	8	1	15
Transverção	1	2	1	3	5
Indels	2	0	11	0	22
h	6	6	3	3	12
H	0.8929	0.8158	0.7333	0.6889	0.9421
$\pi$	0.007143	0.004323	0.014960	0.004563	0.013576

Onde n= número de indivíduos, h= número de haplótipos, H= diversidade gênica e  $\pi$  = diversidade nucleotídica.

#### 4.7.1.2) Diferenciação e estrutura populacional:

As duas espécies apresentaram diferenciação populacional significativa. As populações de *P. costatus* apresentaram um  $F_{st}$  significativo de 0.0652. Os resultados do AMOVA revelaram que 93,48% da variação genética ( $P < 0.05$ ) residia dentro das populações. As populações de *P. argenteus* apresentaram um  $F_{st}$  significativo de 0.125, e 87,42% da variação genética residia dentro das populações ( $P < 0.05$ ) (Tabela 7).

Para *P. costatus*, os valores do  $F_{st}$  par a par variaram de 0.009-0.12 ( $P < 0.05$ ) e foram significativos em cinco das dez comparações (Tabela 8). O sítio III foi significativamente diferente de todos os outros sítios, e o sítio I foi significativamente diferente do sítio V. Para *P. argenteus*, os valores de  $F_{st}$  par a par variaram de 0.04 para 0.30 ( $P < 0.05$ ) (Tabela 9). Apenas os sítios I e III foram significativamente diferentes um do outro.

Tabela 7. Diferenciação populacional de *P. costatus* e *P. argenteus* no rio Paraopeba e suas lagoas marginais.

Grupo amostral	Fonte de variação	Grau de liberdade	Componentes de variância	Varição (%)	F <sub>st</sub>
<i>P. costatus</i>	Entre populações	4	0.47014 Va	6.52	0.06525*
	Dentro de populações	173	6.73525 Vb	93.48	
<i>P. argenteus</i>	Entre populações	4	0.28108 Va	12.58	0.12582*
	Dentro de populações	59	1.95282 Vb	87.42	

\* $P < 0.05$

Tabela 8. Valores do  $F_{st}$  par a par entre os cinco sítios amostrados para todos os indivíduos de *P. costatus* coletados no rio Paraopeba.

	I	II	III	IV	V
I		0.00901	0.15315	0.00000	0.17117
II	0.11938*		0.11712	0.03604	0.01802
III	0.05409	0.05170		0.30631	0.20721
IV	0.12863*	0.03297*	0.00965		0.02703
V	0.04380	0.07474*	0.03058	0.10036*	

As estimativas do  $F_{st}$  par a par estão apresentadas abaixo da diagonal e os valores de  $P$  acima da diagonal.

\* $P < 0.05$

Tabela 9. Valores do  $F_{st}$  par a par entre os cinco sítios amostrados para todos os indivíduos de *P. argenteus* coletados no rio Paraopeba.

	I	II	III	IV	V
I		0.00000	0.20721	0.00901	0.04505
II	0.27839*		0.00000	0.00000	0.00000
III	0.04926	0.25948*		0.00000	0.00000
IV	0.14717 *	0.30975*	0.23906*		0.02703
V	0.06748*	0.08402*	0.07492*	0.12364*	

As estimativas do  $F_{st}$  par a par estão apresentadas abaixo da diagonal e os valores de  $P$  acima da diagonal.

\* $P < 0.05$

#### 4.6.1.3) Isolamento por distância:

Foi observado para as duas espécies um isolamento por distância significativo. Para *P. costatus*, o coeficiente de correlação  $r$  foi 0.115 ( $P < 0.001$ ) (Figura 35), e para *P. argenteus*,  $r$  foi 0.649 ( $P < 0.001$ ) (Figura 36).

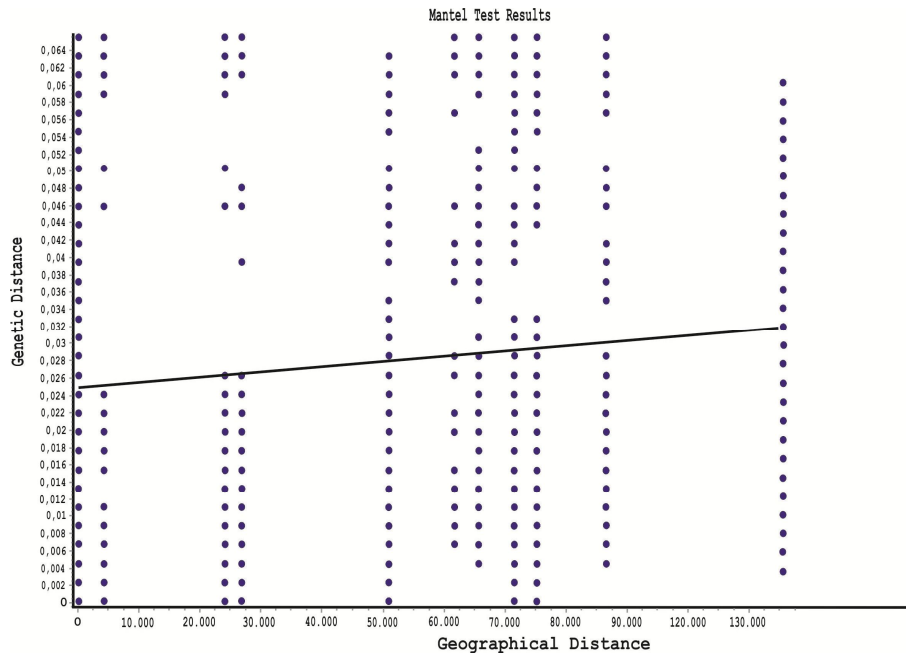


Figura 35: Cálculo do isolamento por distância para *P. costatus* coletados no rio Paraopeba ( $r = 0.115$ ,  $P < 0.001$ ) utilizando-se o programa *Alleles in Space* (Miller 2005).

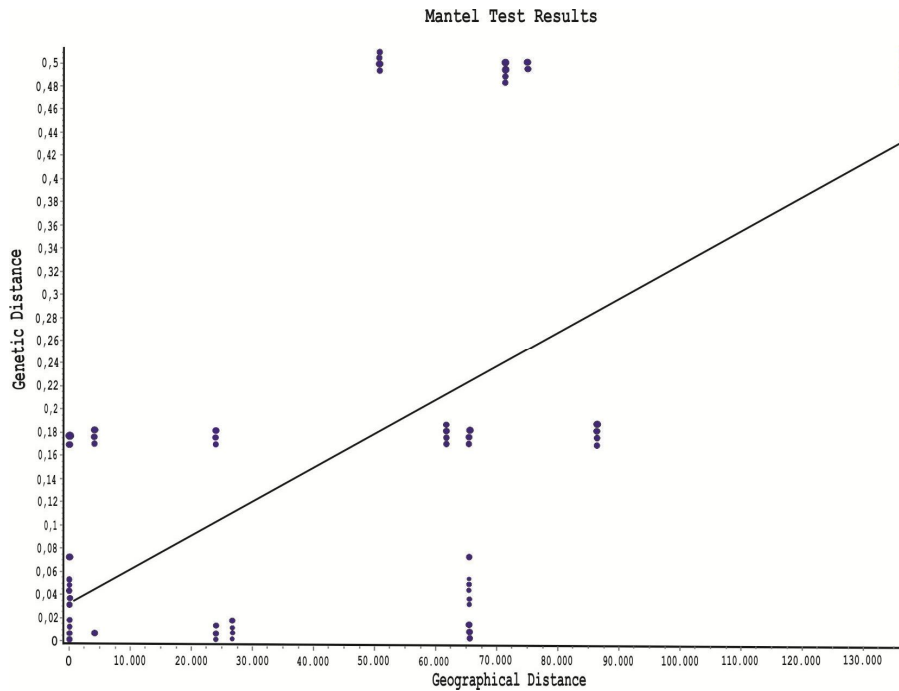


Figura 36: Cálculo do isolamento por distância para *P. argenteus* coletados no rio Paraopeba ( $r = 0.649$ ,  $P < 0.001$ ) utilizando-se o programa *Alleles in Space* (Miller 2005).



#### **4.6.2) Amostras do rio Pará:**

##### *4.6.2.1) Índices de diversidade:*

O marcador molecular 2V35 amplificou um fragmento com cerca de 461 pb em todas as 45 amostras de *P. costatus* coletados no rio Pará. No total, 25-44 substituições e 5-20 indels resultaram em 25 haplótipos únicos de *P. costatus* (Tabela 10).

A maioria dos haplótipos foi encontrada somente em um único sítio de coleta e poucos haplótipos foram compartilhados. O sítio de coleta III compartilha os Hap 1 e Hap 10 com o sítio I e Hap 16 e Hap 19 com o sítio II.

Transições, transversões e indels, além de todos os outros índices de diversidade apresentam-se na Tabela 11 para *P. costatus*. A diversidade genética foi maior (0.9264) na população do rio Pará (sítio I), seguida pela população a montante da barragem de Cajurú, sítio III (0.8874), sendo que a mais baixa foi a da população do trecho entre as barragens de Gafanhoto e Cajurú, sítio II (0.8736).

Tabela 10. Substituições e indels encontrados nos 35 haplótipos do marcador 2V35 para *P. costatus* coletados no rio Pará.

Haplótipos	Sítios de coleta	Sítios Polimórficos																																					
		27	28	30	36	41	48	53	55	57	58	59	64	65	66	68	69	70	71	72	79	83	102	103	104	107	108	109	110	111	116	117	125	129	132	135	139	148	
Hap1	I, III	-	-	T	T	T	C	C	-	C	C	T	T	T	C	C	A	C	T	C	C	C	T	T	T	C	T	C	-	C	C	T	T	C	A	C	C		
Hap2	I	T	C	.	.	.	T	.	.	.	.	G	A	A	T	C	G	A	T	.	.	A	C	C	-	-	C	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap3	I	-	-	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	C	T	T	T	.	.	.	.	T	T	.	.
Hap4	I	T	T	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	C	C	-	-	C	T	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	
Hap5	I	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	-	C	T	T	T	.	.	.	.	T	T	.	.	.	
Hap6	I	T	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	-	C	T	C	G	.	.	C	T	T	.	T	.	
Hap7	I	-	-	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	-	C	T	C	G	.	.	.	.	T	T	.	T	
Hap8	I	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	C	T	T	T	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap9	I	-	-	.	.	.	T	.	G	G	G	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	A	A	A	A	A	G	.	.	.	.	T	T	.	T	
Hap10	I, III	T	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G	.	.	.	.	T	T	.	T	
Hap11	I	T	C	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	C	C	-	-	C	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap12	I	T	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	-	C	T	C	G	.	.	.	.	T	T	.	T	
Hap13	III	T	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G	.	A	.	.	T	T	.	T	
Hap14	III	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	C	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap15	III	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap16	II, III	-	-	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G	.	.	.	.	T	T	.	T	
Hap17	III	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap18	III	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap19	II, III	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	.	T	T	A	.	
Hap20	II	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap21	II	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap22	II	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	C	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap23	II	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap24	II	-	-	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap25	II	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Haplótipos	Sítios de coleta	Sítios polimórficos																													
		160	193	201	234	241	243	271	275	290	293	325	336	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	364	372	378	384	407
Hap1	I, III	T	T	C	C	T	T	T	T	G	T	C	C	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	T	C	T	T	G	C	C	A
Hap2	I	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap3	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap4	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap5	I	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap6	I	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	T
Hap7	I	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap8	I	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap9	I	A	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap10	I, III	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	T
Hap11	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap12	I	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	T
Hap13	III	.	C	T	T	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	T
Hap14	III	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap15	III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T
Hap16	II, III	.	.	T	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap17	III	.	.	T	T	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T
Hap18	III	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap19	II, III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap20	II	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap21	II	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T
Hap22	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T
Hap23	II	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T
Hap24	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	T
Hap25	II	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.

Tabela 11. Índices de diversidade molecular de *P. costatus* observados para os três sítios de coleta do rio Pará sugerindo uma combinação de polimorfismos que dão origem aos haplótipos.

	Locais de coleta		
	I	II	III
<b><i>P. costatus</i></b>			
Substituição	44	25	27
Transição	24	19	20
Transversão	20	6	7
Indels	20	5	19
h	12	8	9
H	0.9264	0.8736	0.8874
$\pi$	0.042471	0.017420	0.035805

Onde n= número de indivíduos, h= número de haplótipos, H= diversidade gênica e  $\pi$  = diversidade nucleotídica. Número de amostras = 45.

#### 4.7.2.2) Diferenciação e estrutura populacional:

A espécie apresentou diferenciação populacional significativa. As populações de *P. costatus* apresentaram um  $F_{st}$  significativo de 0.16727. Os resultados do AMOVA revelaram que 83.27% da variação genética ( $P < 0.05$ ) residia dentro das populações (Tabela 12). Os valores do  $F_{st}$  par a par variaram de 0.090–0.230 ( $P < 0.05$ ) e foram significativos em todas as comparações (Tabela 13).

Tabela 12. Diferenciação populacional de *P. costatus* no rio Pará.

Grupo amostral	Fonte de variação	Grau de liberdade	Componentes de variância	Varição (%)	$F_{st}$
<i>Prochilodus costatus</i>	Entre populações	2	1.47218 Va	16.73	$F_{st} = 0.16727$
	Dentro de populações	87	7.32912 Vb	83.27	

\* $P < 0.05$

Tabela 13. Valores do  $F_{st}$  par a par entre os cinco sítios amostrados para todos os indivíduos de *P. costatus* coletados no rio Pará.

	I	II	III
I		0.00000	0.01040
II	0.23024 *		0.00000
III	0.09031*	0.19351*	

As estimativas do  $F_{st}$  par a par estão apresentadas abaixo da diagonal e os valores de  $P$  acima da diagonal. \* $P < 0.05$

#### 4.6.2.3) Isolamento por distância:

Foi observado para a espécie um isolamento por distância significativo. O coeficiente de correlação  $r$  foi 0.196 ( $P < 0.001$ ) (Figura 37).

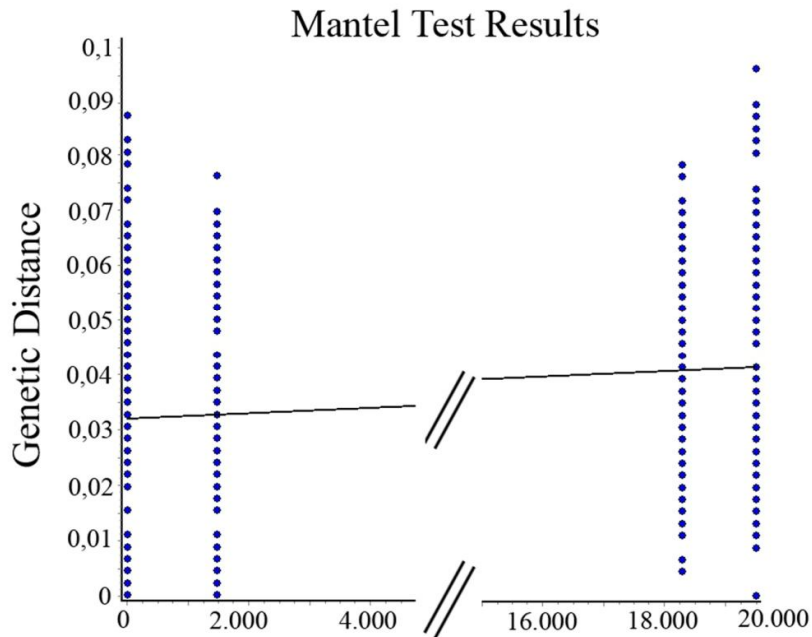


Figura 37: Cálculo do isolamento por distância para *P. costatus* coletados no rio Pará ( $r = 0.196$ ,  $P < 0.001$ ) utilizando-se o programa *Alleles in Space* (Miller 2005).

#### 4.6.2.4) Análise filogenética:

A reconstrução filogenética dos haplótipos do marcador molecular 2V35 revelaram três *clusters* fortemente suportados por valores de *bootstrap* superiores a 80% (Figura 38).

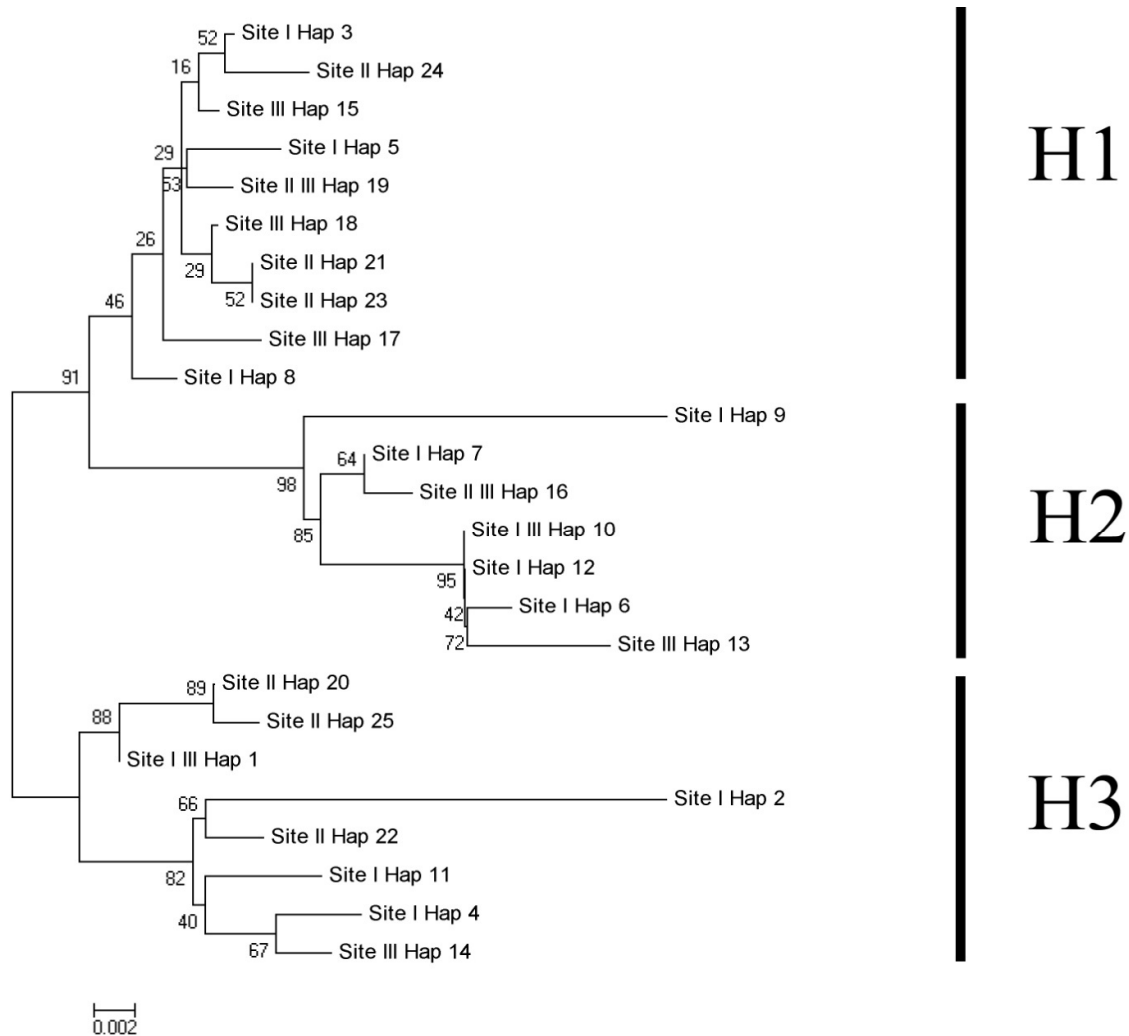


Figura 38: Árvore filogenética da espécie *P. costatus* coletada no rio Pará, construída utilizando-se o algoritmo NJ com base em 25 haplótipos do marcador molecular 2V35. Os números próximos aos ramos indicam *bootstrap* de 10.000 repetições. Três *clusters* são evidentes.

#### 4.6.3) Amostras do rio Grande:

##### 4.6.3.1) Índices de diversidade:

O marcador molecular 2V35 amplificou um fragmento com cerca de 469 pb em todas as 86 amostras de *P. costatus* coletadas no rio Grande, a jusante da UHE Porto Colombia e utilizadas como matrizes reprodutoras na Estação Ambiental de Volta

Grande. No total, 28 substituições e 74 indels resultaram em 36 haplótipos únicos de *P. lineatus* (Tabela14).

Transições, transversões e indels, além de todos os outros índices de diversidade apresentam-se na Tabela15 para *P. lineatus*. A diversidade genética das matrizes foi alta (0.8879).

Tabela 14. Substituições e indels encontrados nos 35 haplótipos do marcador 2V35 para *P. lineatus* coletados no rio Grande.

Haplótipos	Sítios polimórficos																																	
	38	39	40	41	42	43	44	45	46	48	58	59	78	114	130	133	146	158	159	160	161	162	163	190	191	192	193	194	195	196	197	198		
Hap 1	G	T	C	T	C	T	C	C	C	T	T	T	T	G	T	T	T	T	G	T	G	C	C	C	T	C	T	C	C	A	T	G		
Hap 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	C	-	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	C	.	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	-	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	-	A	C	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	-	A	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap 19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	-	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	-	A	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 30	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.



Haplótipos	Sitios polimórficos																															
	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	224	225	229	232	234	235	260	261	262	263	264	265	
Hap 1	T	C	T	C	T	A	C	C	T	C	T	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	T	T	C	-	-	-	-	-	
Hap 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 4	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 5	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 9	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 11	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 13	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 17	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 19	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	A	T	C	C	T
Hap 23	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 29	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	G	.	.	.	.	.	.	.
Hap 30	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	G	G	.	.	.	.	.	.	.
Hap 33	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Haplótipos	Sitios polimórficos																											
	266	267	268	278	279	319	320	333	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	380	382	386		
Hap 1	-	-	-	-	-	C	G	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	C	C	C	G	G	T		
Hap 2	-	-	-	C	T	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 3	-	-	-	-	-	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.		
Hap 4	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 5	-	T	G	C	T	-	-	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	T	T	.	.	C		
Hap 6	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 7	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 8	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 9	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 10	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 11	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 12	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 13	-	-	-	-	-	.	.	.	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 14	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 15	-	-	-	-	-	.	.	.	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 16	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 17	-	-	-	-	-	.	.	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 18	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 19	-	-	-	-	-	.	.	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 20	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 21	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	.		
Hap 22	C	T	G	C	T	.	A	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	.	T	.	.	.	.		
Hap 23	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 24	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 25	-	-	-	-	-	.	.	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	T	T	C		
Hap 26	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 27	-	-	-	-	-	T	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 28	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 29	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 30	-	-	-	-	-	.	.	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 31	-	-	-	-	-	T	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 32	-	-	-	-	-	T	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	T	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 33	-	-	-	-	-	.	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 34	-	-	-	-	-	.	.	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 35	-	-	-	-	-	.	.	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		
Hap 36	-	-	-	-	-	T	.	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	.	.	T	.	.	.	C		

Tabela 15. Índices de diversidade molecular das matrizes reprodutoras de *P. costatus* da EAVG coletadas a jusante da UHE Porto Colombia, rio Grande sugerindo uma combinação de polimorfismos que dão origem aos haplótipos.

Estadística	Matrizes de <i>P. costatus</i> da EAVG
Substituição	28
Transição	20
Transversão	8
Indels	74
h	36
H	0,8879
$\pi$	0,029327

Onde h= número de haplótipos, H= diversidade gênica e  $\pi$  = diversidade nucleotídica. Número de amostras = 86.

#### 4.7.3.2) Análise filogenética:

A reconstrução filogenética dos haplótipos do marcador molecular 2V35 revelou valores de *bootstrap* relativamente pobres sugerindo uma falta de estruturação haplotípica, apesar de dois *clusters* se apresentarem fortemente suportados por valores de *bootstrap* superiores a 75% (Figura 39).



#### 4.6.4) Amostras de *Prochilodus* spp. dos rios Paraopeba, Pará e Grande:

##### 4.6.4.1) Índices de diversidade:

O marcador molecular 2V35 amplificou fragmentos variando de 459-469 pb em todas as 252 amostras de *Prochilodus* spp. coletadas nos rios Paraopeba, Pará e Grande.

A maioria dos haplótipos encontrados foram exclusivos por bacia e apenas um haplótipo foi compartilhado pelas três espécies (Hap 1).

Transições, transversões e indels, além de todos os outros índices de diversidade apresentam-se na Tabela 16 para *Prochilodus* spp. A diversidade genética foi maior (0.8998) na população de *P. argenteus* coletada no rio Paraopeba, seguida pela população de *P. costatus* também coletada no rio Paraopeba (0.8914), seguida pela população de *P. lineatus* do rio Grande representada pelas matrizes da EAVG (0.8879), sendo que a mais baixa foi a da população *P. costatus* coletada no rio Pará (0.8557).

Tabela 16. Índices de diversidade molecular observados para *Prochilodus* spp. sugerindo uma combinação de polimorfismos que dão origem aos haplótipos.

	I / <i>P. costatus</i>	II / <i>P. costatus</i>	III / <i>P. lineatus</i>	IV / <i>P. argenteus</i>
Substituição	18	22	28	31
Transição	14	17	20	22
Transversão	4	5	8	9
Indels	14	14	74	24
h	35	25	36	22
H	0.8914	0.8557	0.8879	0.8998
$\pi$	0.030841	0.032035	0.029327	0.009542

Onde I= rio Paraopeba, II= rio Pará, III= rio Grande, IV= rio Paraopeba, h= número de haplótipos, H= diversidade gênica e  $\pi$  = diversidade nucleotídica. Número de amostras = 252.

##### 4.6.4.2) Diferenciação e estrutura populacional:

O gênero apresentou diferenciação populacional significativa quando comparadas as populações dos três rios. As populações de *Prochilodus* spp. apresentaram um  $F_{st}$  significativo de 0.29846. Os resultados do AMOVA revelaram que 70.15 % da variação

genética ( $P < 0.05$ ) residia dentro das populações (Tabela 17). Os valores do  $F_{st}$  par a par variaram de 0.04308–0.61471 ( $P < 0.05$ ) e foram significativos em todas as comparações (Tabela 18).

Tabela 17. Diferenciação populacional de *Prochilodus* spp. nos rios Paraopeba, Pará e Grande.

Grupo amostral	Fonte de variação	Grau de liberdade	Componentes de variância	Varição (%)	$F_{st}$
<i>Prochilodus</i> spp.	Entre populações	3	2.60585 Va	29.85	$F_{st} = 0.29846$
	Dentro de populações	506	6.12522 Vb	70.15	

\* $P < 0.05$

Tabela 18. Valores do  $F_{st}$  par a par entre os quatro sítios amostrados para todos os indivíduos de *Prochilodus* spp.

	I	II	III	IV
I		0.00488	0.00000	0.00000
II	0.04308 *		0.00000	0.00000
III	0.20579 *	0.16734 *		0.00000
IV	0.42844*	0.41489*	0.61471*	

As estimativas do  $F_{st}$  par a par estão apresentadas abaixo da diagonal e os valores de  $P$  acima da diagonal.

\* $P < 0.05$

## 5) DISCUSSÃO

### 5.1) Marcadores Moleculares

A partir dos anos 90, ficaram disponíveis várias técnicas de biologia molecular para a detecção de variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA, como por exemplo, RFLP, AFLP, RAPD, MtDNA, microssatélites, dentre outros. Com o desenvolvimento de novas técnicas, novos marcadores vêm sendo localizados em regiões do genoma nuclear e mitocondrial (Parker *et al.* 1998, Vrijenhoek 1998).

Com o advento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), os marcadores microssatélites passaram a ser os mais difundidos, ocupando um lugar de destaque nas análises populacionais, sendo considerado o mais popular para mapeamentos genéticos, reconstrução filogenética, identificação individual, verificação de paternidade e análises forenses (Jarne & Lagona 1996, Schlötterer 2004). Suas características o tornam adequado para análises genético-populacionais, com destaque para sua grande quantidade

de polimorfismos devido à alta taxa mutacional permitindo uma análise mais detalhada de seu padrão de mutação (Schlötterer 2002, Zane *et al.* 2002, Schlötterer 2004).

Os microssatélites são considerados marcadores neutros, sendo assim, as taxas de evolução dessas seqüências são determinadas exclusivamente pela mutação. As expansões e contrações de repetições, bem como as taxas com a qual isso ocorre, variam de acordo com o grupo taxonômico, a localização do microssatélite dentro do genoma, o tipo de seqüência, os mecanismos de reparo mutacional do organismo em questão, o tamanho da seqüência que compõem o marcador, o tamanho do genoma, etc (Ellegren 2004).

Os marcadores microssatélites possuem um padrão mutacional complexo, devido à natureza complexa da evolução dos mesmos, requerendo cautela ao inferir sobre a determinação de tempo absoluto de divergência evolutiva entre populações ou espécies próximas (Ellegren 2004, Schlötterer 2004), por exemplo, do mesmo gênero, como é o caso das três espécies estudadas neste trabalho. Estudos populacionais utilizando marcadores microssatélites devem ser realizados analisando o comportamento mutacional de cada marcador empregado (Ellegren 2004).

A natureza da evolução dos marcadores microssatélites é tema de intenso debate e tem atraído a atenção de diversos grupos que adotam diferentes abordagens para seu estudo (Levinson & Gutman 1987, Shiver *et al.* 1993, Freitas 2007). Os microssatélites seguem preferencialmente o modelo de mutação “passo-a-passo” (*Stepwise Mutation Model* – SMM) onde a mutação pode acontecer somando ou diminuindo uma seqüência repetitiva à seqüência herdada do indivíduo, por evento de mutação (Ellegren 2004). Porém, a mutação nestes marcadores não é estrita ao modelo SMM por que a taxa de mutação se eleva com o aumento no tamanho do alelo, neste caso mutações de duas ou mais seqüências repetitivas são comuns (Schlötterer & Tautz 1992, Balding 2006).

Modelos mais recentes têm postulado um equilíbrio entre o aumento de repetições e as mutações de ponto dentro do marcador, que agiriam como um fator que limitaria o crescimento indefinido dos mesmos à medida que imperfeições são inseridas na seqüência repetitiva (Kruglyak *et al.* 1998, Calabrese *et al.* 2001). Nas análises realizadas neste trabalho foi considerada a identidade de cada haplótipo, desconsiderando as relações de distância esperadas entre diferentes alelos pelo modelo SMM.

Segundo Jin *et al.* (1994) e Ellegren (2004), os microssatélites podem ser classificados de acordo com o motivo de repetição, número de bases repetidas, em mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídeos; e de acordo com sua estrutura seqüencial, em três tipos: perfeitos, que contêm um único motivo de repetição  $n$  vezes; compostos, que estão constituídos por mais de uma seqüência repetitiva diferente e os de repetições complexas,

que podem conter várias unidades de blocos repetitivos de comprimento variável assim como seqüências intervenientes variáveis (Urquhart *et al.* 1994, Menezes 2005).

Marcadores de complexas repetições hipervariáveis também existem e são caracterizados por conter numerosos haplótipos não consensuais que diferem tanto em tamanho quanto em seqüência apresentando um alto grau de polimorfismo, sendo que este tipo de marcador é caracterizado por alta heterozigosidade (Urquhart *et al.* 1993, Gill *et al.* 1994, Cruz *et al.* 2006). Este tipo de marcador não é comumente utilizado em análises forenses devido às dificuldades encontradas em relação à nomenclatura alélica e à padronização de medidas de variabilidade entre laboratórios. Apesar disso, dois kits comerciais utilizados para teste de paternidade humana incluem o locus de complexas repetições hipervariáveis SE33, às vezes chamado ACTBP2, sendo um deles monoplex: PowerPlex® ES Monoplex System, SE33 (JOE) (Urquhart *et al.* 1993, Promega Corporation 2002, Applied Biosystems 2002, Pinto 2010). No presente trabalho o marcador de complexas repetições hipervariáveis 2V35 foi escolhido para o desenvolvimento das análises populacionais de três espécies de peixes migratórios do gênero *Prochilodus*: *P. costatus*, *P. lineatus* e *P. argenteus*, se mostrando adequado para a análise de variabilidade genética e estrutura populacional das espécies em questão. O marcador apresentou um nível alto de variação com numerosos haplótipos não consensuais, diferindo tanto em tamanho quanto em seqüência para as três espécies estudadas.

Uma das vantagens da utilização de marcadores nucleares que se encontram em regiões não codificantes é que praticamente todas as mutações irão contribuir para o polimorfismo (Ellegren 2004, Schlötterer 2000, Zane *et al.* 2002). Mutações em regiões regulatórias e/ou codificantes são mais raras, pois sua fixação na população depende de vantagens adaptativas podendo ser eliminada por seleção (Chenuil 2006). Nossos dados indicaram que o 2V35 é um marcador nuclear não codificante (Urquhart *et al.* 1993, Schlötterer 2000, Zane *et al.* 2002, Ellegren 2004) considerando a falta de similaridade de seqüência com bancos de dados de proteínas (por buscas no BlastX; dados não mostrados) e um alto nível de polimorfismo permitido pelo acúmulo de mutações em uma região não codificante.

## **5.2) Biblioteca genômica e seqüenciamento**

A biblioteca genômica primária de *P. lineatus*, pertencente ao Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, possui uma coleção de mais de 10.000 clones de fragmentos acima de 400pb. A natureza da biblioteca é não-enriquecida, assegurando que



os fragmentos nela presentes são uma amostra bem aleatorizada do genoma de *P. lineatus*. Sendo assim, ela pode ser triada para qualquer outro gene ou tipo de marcador de interesse (Yazbeck 2007).

Foram seqüenciados ao todo, 71 clones positivos selecionados a partir da biblioteca genômica do peixe *P. lineatus*, sendo que 19 (26%) possuíam pelo menos uma seqüência repetitiva com potencial para se tornar um marcador molecular. Foram encontradas ao todo 27 seqüências repetitivas e a maior parte das seqüências encontradas (18) foram da classe dos dinucleotídeos, seguido de seis trinucleotídeos, dois tetranucleotídeos e um pentanucleotídeo. Durante a triagem radioativa, foram utilizadas várias sondas de diferentes temas de microssatélites (Yazbeck 2007), sendo essa uma estratégia essencial para organismos pouco caracterizados genomicamente, já que há grande variação da abundância de tipos distintos de temas entre grupos taxonômicos (Zane *et al.* 2002).

A freqüência do tipo e do motivo de repetições varia muito entre os grupos taxonômicos, mas de maneira geral têm-se notado que dinucleotídeos são mais abundantes em muitos genomas (Katti *et al.* 2001, Carreras *et al.* 2005, Hatanaka *et al.* 2006, Yazbeck & Kalapothakis 2007, Paiva & Kalapothakis 2008), o que corrobora a proporção encontrada neste trabalho. Trinucleotídeos costumam ser mais freqüentes em regiões codificadoras em função da compatibilidade de inserções, que não alteram as matrizes de leitura (ORFs) na expressão gênica (Armour 2006). Destacando também que apesar de terem sido utilizadas sondas com vários motivos diferentes de repetições na hibridização da biblioteca, poucas seqüências com tri, tetra ou pentanucleotídeos foram encontradas. O que, novamente, sugere que as repetições de dinucleotídeos sejam muito mais abundantes que as demais no genoma de *P. lineatus*.

De acordo com Estoup & Angers (1998), iniciadores de regiões de marcadores microssatélites desenvolvidos para uma espécie, algumas vezes amplificam o *locus* em outra espécie proximamente relacionada. O marcador encontrado na biblioteca genômica de *P. lineatus* se mostra presente em *P. costatus* e *P. argenteus*, levando a concluir que as regiões flanqueadoras onde os iniciadores foram desenhados permanecem conservadas dentro do gênero.

### **5.3) Desenho e teste de iniciadores para PCR**

Uma condição importantíssima para a obtenção de *loci* analisáveis é a região flanqueadora da seqüência, que deve possuir uma composição de bases que permitam o desenho de iniciadores eficientes na amplificação via PCR. Esta é uma etapa limitante para

escolha dos marcadores, pois muitos, apesar de, possuírem boas repetições, não possuem seqüências flanqueadoras suficientes ou com boa composição de bases. Normalmente são raros os trabalhos de isolamento de seqüências microssatélites onde se obtém mais de 20 *loci* utilizáveis em análise populacional.

Esse projeto, assim como a maioria que envolve o isolamento de seqüências microssatélites em diferentes espécies, provou que a obtenção de boas seqüências para análise populacional é um trabalho minucioso, onde se parte de uma enorme quantidade de possibilidades, que vão sendo reduzidas à medida que são vencidas as várias etapas metodológicas. Assim, de 71 clones positivos seqüenciados, apenas 19 foram cuidadosamente escolhidos para serem utilizados, sendo que 8 (Figura 24) foram submetidos a uma bateria de testes de padronização durante o mestrado e o doutorado. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3* v. 0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000) e a padronização da PCR envolveu a determinação da temperatura ótima de anelamento ( $T_m$ ) e as concentrações ótimas de taq Polimerase e iniciadores, além da escolha do tipo de tampão. Para o desenho dos iniciadores, foram preferidas seqüências com o percentual mais próximo possível de 60% de conteúdo C/G e o tamanho dos mesmos ficou entre 20 e 24 pares de base.

#### **5.4) Análises populacionais**

Uma amostragem de 252 peixes coletados nos rios Paraopeba, Pará e Grande foi submetida à amplificação do locus 2V35 aqui determinado. As bandas geradas pelo marcador nas amplificações de cada exemplar utilizado nesse trabalho foram genotipadas via seqüenciamento automático de DNA.

A genotipagem via seqüenciamento vem sendo utilizada em estudos populacionais de peixes neotropicais (Dergam *et al.* 2002, Hatanaka *et al.* 2006, Barbosa *et al.* 2008, Carvalho-Costa *et al.* 2008). A grande vantagem da utilização desse método em relação à análise via gel de poliacrilamida é a obtenção de resultados rápidos e altamente sensíveis, podendo-se observar tanto os polimorfismos oriundos de extensões ou contrações de repetições quanto as mutações de ponto e *indels*. A designação correta de seqüências haplotípicas é crítica para uma estimativa fidedigna de diversidade e estruturação populacional (Amos *et al.* 2007). O erro nesse procedimento pode ocasionar problemas consideráveis, como, por exemplo, na identificação individual e de paternidade, sendo que no último caso, pode-se ter como resultado uma falsa exclusão. Além disso, esta pode gerar

erros nos cálculos de distância e estrutura genética interpopulacional, distorcendo parâmetros como a diversidade gênica e o índice de fixação  $F_{st}$ .

Hoje, já é possível contar com alta tecnologia e qualidade em termos de genômica estrutural, funcional e comparativa. Tais tecnologias são denominadas métodos de seqüenciamento de última geração (SOLID, GS FLX 454, Ion Torrent) que em associação aos métodos convencionais proporcionam o seqüenciamento completo de diferentes genomas (desde um simples vírus até genomas complexos como o genoma humano). A associação das duas tecnologias promete um resultado mais concreto, mas ainda não é viável para uma análise populacional devido a custos e análise mais complexa.

### 5.5) Rio Paraopeba

Foi feita a caracterização da diversidade genética e estrutura populacional de *P. costatus* e *P. argenteus*, duas importantes espécies de peixes endêmicas da bacia do São Francisco, no rio Paraopeba. Este estudo é significativo na medida em que foram estudados os níveis de diversidade antes da construção da UHE Retiro Baixo. Foi avaliada a variação do novo marcador molecular, 2V35, com numerosos haplótipos não consensuais de amostras de cinco locais em toda a bacia do Paraopeba, que diferem em tamanho e seqüência.

Medidas de diversidade genética para as duas espécies apresentaram altos níveis de diferenciação com relação à variabilidade genética para os cinco locais estudados. Da mesma forma, utilizando-se marcadores microssatélites, as populações de *P. argenteus* perto da barragem de Três Marias foram significativamente divergentes das populações mais a jusante na bacia do São Francisco (Hatanaka & Galleti Jr. 2003, Hatanaka *et al.* 2006).

De acordo com Nakatani *et al.* (1997), peixes migratórios, incluindo *Prochilodus* sp. (Agostinho *et al.* 1993), geralmente desovam no canal principal do rio com os ovos e / ou larvas pelágicas posteriormente concentrada em zonas húmidas circundantes e lagoas marginais. Os padrões observados de diversidade genética na bacia do Paraopeba provavelmente refletem esse comportamento. A lagoa marginal Piranhas (sítio IV) teve a menor diversidade genética e os valores do  $F_{st}$  par a par indicaram uma diferença considerada significativa do sítio III (lagoa marginal de Chiqueiros) para ambas as espécies, que podem estar relacionados a fatores ambientais nestes sítios, como, por exemplo, o fato de que essa lagoa não é permanente.

Diferenças na capacidade de dispersão podem afetar o fluxo gênico, levando à deriva passiva de algumas áreas da migração de adultos para os locais onde os ovos e as larvas pelágicas são encontrados (Maggio *et al.* 2009). No entanto, alguns peixes neotropicais migratórios desovam sem migrar e demonstram um comportamento de *homing* mais fraco do que o de salmonídeos (Carolsfeld *et al.* 2003). O isolamento por distância significativo nestas espécies sugere que a migração (ou pelo menos migrações de longa distância) não é necessária para a desova.

Trinta e três áreas de Minas Gerais têm sido reconhecidas como prioritárias para a conservação da biodiversidade de peixes, e o rio Paraopeba foi classificado na categoria de alta importância biológica (Drumond *et al.* 2005). O rio Paraopeba inclui áreas com espécies raras ou ameaçadas de extinção e vegetação importantes. Nossos dados genéticos claramente identificaram cinco unidades evolutivas significativas (ESUS) para a conservação. Para ambas as espécies, os valores de  $F_{st}$  indicaram uma diferenciação populacional significativa (*P. costatus*:  $F_{st} = 0.065$ ,  $p < 0,05$ ; *P. argenteus*:  $F_{st} = 0.125$ ,  $p < 0,05$ ). Da mesma forma, o padrão de poucos haplótipos compartilhados do marcador 2V35 sugere fluxo gênico restrito entre as populações.

## 5.6) Rio Pará

Foi caracterizada a diversidade genética e estrutura populacional de *P. costatus* no rio Pará. O marcador molecular 2V35 se mostrou altamente variável entre as populações com 25 haplótipos únicos provenientes de três localidades distintas do rio.

A fragmentação de peixes migratórios de água doce por consequência da construção de barragens pode reduzir o fluxo gênico entre populações levando a uma diminuição da diversidade genética dentro das populações e a uma diferenciação genética significativa entre as populações de peixes (Jager *et al.* 2001, Neraas & Spruell 2001). Alternativamente, nenhuma diferença pôde ser encontrada entre a diversidade genética de populações acima e abaixo das barragens (Neraas & Spruell 2001, Denier *et al.* 2007). No presente estudo, *P. costatus* apresentou altos níveis de diversidade genética dentro e entre populações.

As diferenças na diversidade genética entre as populações de *P. Costatus* do rio Pará podem ser o resultado da ausência de migração causada pela implementação das duas barragens ao longo do rio, pelo programa de repovoamento que acontece no rio Pará por mais de 20 anos, e pelo comprimento do fragmento do rio de somente 30 km. Esses fatores podem estar agindo independentemente ou em conjunto na formação da estrutura populacional de *P. costatus* no rio Pará. O número limitado de haplótipos compartilhados

entre as populações e o resultado significativo da correlação entre matrizes no isolamento por distância, sugerem que houve pouco ou nenhum fluxo gênico entre as duas barragens por mais de 6 décadas (Santos & Sato 2012, comunicação pessoal).

Programas de repovoamento são amplamente utilizados para a restauração da queda de populações naturais. No Brasil, esses programas estão em vigor desde 1970 para restaurar populações de peixes e manter ou aumentar a produção pesqueira (Madeira *et al.* 2005, Agostinho *et al.* 2007, Araki *et al.* 2007, Fraser 2008). Em programas de reprodução em cativeiro, que utilizam peixes locais selvagens como reprodutores, espera-se uma produção de alevinos com diferenças mínimas de *fitness* quando comparados aos peixes selvagens (Araki *et al.* 2007). A diversidade genética altamente significativa entre as três populações estudadas sugere que a estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, da Companhia de Desenvolvimento do São Francisco e Parnaíba (CODEVASF) têm implementado com sucesso o programa de repovoamento local. A reprodução normalmente é feita por casal de peixes e após uma reprodução os peixes não são mais utilizados. Os reprodutores são capturados em duas regiões do rio São Francisco: a jusante da barragem da UHE de Três Marias e a jusante da confluência dos rios São Francisco com o rio Abaeté. Normalmente são coletadas de 100 a 200 indivíduos e repostas depois de alguns anos (2 a 4 anos), conforme a necessidade (Sato 2012, comunicação pessoal). Neste programa de reprodução em cativeiro, grupos distintos de alevinos de cativeiro são liberados, separadamente, nos três locais (Santos & Sato 2012, comunicação pessoal).

A estrutura genética das populações nos rios fragmentados pode mudar mais rapidamente do que em populações que habitam rios ininterruptos (Reid *et al.* 2008). Neste trabalho, os sítios II e II (Figura 3) estão em fragmentos curtos do rio e por isso significativamente mais afetados pelo barramento. Por ser um peixe migratório, acredita-se que a população de *P. costatus* destes dois sítios não são capazes de reproduzir por causa do tamanho reduzido do segmento do rio disponível para migrações reprodutivas e ausência de condições naturais para o recrutamento como áreas de inundação.

Entre os três locais de amostragem, o sítio I (Figura 3) se mostrou o menos afetado pelas barragens, pelo programa de repovoamento e pela fragmentação do rio. Os alevinos oriundos da reprodução em cativeiro estão em contato com populações selvagens existentes a jusante da UHE Gafanhoto (Figura 4) e neste local, existem condições naturais para o recrutamento. Existem várias lagoas marginais que funcionam como berçários de *P. costatus* nas margens dos rios Itapeçerica, Paraopeba e São Francisco (Santos & Sato 2012, comunicação pessoal). Devido ao trecho muito grande e livre de barreiras, além da presença de sítios de desova, a quantidade de alevinos de *P. costatus* liberada através do

repopoamento, provavelmente ainda não foi suficiente para afetar geneticamente a população natural existente. Por outro lado, o sítio II está localizado em um pequeno fragmento do rio, com barreiras para o fluxo gênico em ambas as extremidades e um tamanho populacional reduzido. O sítio III possui comprimento e tamanho populacional intermediário: 426 metros de comprimento, com uma área alagada de 27 Km<sup>2</sup> (Alves 2007) quando comparado aos outros dois sítios. A diversidade genética observada e a estrutura populacional nos sítios II e III são diretamente dependentes dos programas de repovoamento da região.

### **5.7) Rio Grande**

Uma amostra de 86 matrizes provenientes da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG), coletadas a jusante da UHE Porto Colombia, no rio Grande, foi submetida à amplificação do locus 2V35 com o objetivo de se obter uma genotipagem das mesmas. Todas essas matrizes apresentaram sucesso reprodutivo na safra de 2010/2011, sendo que seus alevinos estão sendo utilizados em programas de repovoamento da CEMIG.

Nos sistemas de reprodução em cativeiro oriundos de pisciculturas, os cruzamentos diferem daqueles que ocorrem em ambiente natural, que são aleatórios. Em sistemas fechados o cruzamento é feito com um número reduzido de indivíduos quando comparado aos que ocorrem em ambiente natural. Neste caso poderia ocorrer um aumento do cruzamento entre indivíduos aparentados mais do que ocorreria por acaso, uma condição conhecida como endogamia. A endogamia tem como consequência o aumento da homoziguidade, e, portanto, uma redução na heteroziguidade, resultando no declínio da variabilidade genética (Hallerman 2003). Esta situação normalmente permite que alelos deletérios recessivos entrem em homozigose e manifestem fenótipos indesejáveis, que podem variar de deformidades grosseiras, ou de forma indireta, por uma redução da sobrevivência das larvas, da viabilidade de juvenis e a susceptibilidade a doenças (Appleyard & Mather 2000, Lutz 2001).

A variabilidade genética é o atributo mais importante em uma população e constitui o material sobre o qual a seleção natural age. Uma população com variabilidade elevada, como a que foi constatada na análise das 86 matrizes da EAVG, terá maior possibilidade de enfrentar com sucesso as mudanças do ambiente (Sbordoni *et al.* 1986). A variabilidade genética pode ser medida e quantificada em análises moleculares, estas análises são utilizadas para diagnosticar a estrutura de uma determinada população, e como ferramentas para tal estudo são utilizados os marcadores moleculares. Dentre os marcadores mais

informativos estão os de microssatélites, tendo em vista sua expressão co-dominante e o multialelismo (Curran 1997). Cada variante alélica de um dado locus em uma população pode ser tomada como parte de um “recurso genético” na população (Beaumont & Hoare 2002). Um único alelo ou uma combinação de alelos (haplótipos) poderá ser responsável por conferir ao portador uma característica valiosa, como, por exemplo, a resistência a uma determinada doença, uma maior tolerância às mudanças de temperatura ou um melhor crescimento, de tal modo que a perda de variantes haplotípicas compromete a sustentabilidade da população (Meffe 1986).

O marcador molecular 2V35 se mostrou suficientemente variável entre as amostras analisadas resultando em 36 haplótipos únicos de *P. lineatus*, podendo caracterizar a diversidade genética (0.8879) das matrizes utilizadas em programas de repovoamento da CEMIG, no rio Grande. Diferentes parâmetros genéticos, tais como os índices de diversidade analisados (diversidade gênica, diversidade nucleotídica, transições, transversões, substituições e indels) e a reconstrução filogenética dos 36 haplótipos encontrados foram obtidos na população de *P. lineatus*, analisada neste trabalho, a partir da genotipagem do marcador de complexas repetições hipervariáveis 2V35. A falta de estruturação haplotípica evidenciada pela reconstrução filogenética dos 36 haplótipos do marcador molecular 2V35 evidencia que os 86 indivíduos coletados a jusante da UHE Porto Colombia pertencem a uma mesma população.

Tais parâmetros permitirão comparar posteriormente os efeitos do manejo dos reprodutores na eficácia dos programas de repovoamento de curimbas realizados na região da UHE Volta Grande e UHE Jaguará.

#### **5.8) Amostras de *Prochilodus* spp. dos rios Paraopeba, Pará e Grande: a eficiência do marcador 2V35**

O estudo populacional, por muitos anos era baseado nos fenótipos dos organismos. Sendo estas variações raras, as populações por várias vezes foram classificadas como homogêneas (Futuyama 1992). De acordo com Linch & Walsh (1998), o emprego de marcadores moleculares teve início na década de 80, e são assim denominados por utilizarem o polimorfismo da molécula de DNA, havendo para isso, grande variedade de técnicas desenvolvidas e tipos de marcadores utilizados.

Diversas técnicas moleculares têm sido amplamente aplicadas em estudos de genética pesqueira em diferentes países, onde são utilizados sistemas polimórficos para a

comparação das frequências gênicas de diferentes populações ao longo da área a ser explorada (Ovenden 1990, Thorpe *et al.* 2000, Ward *et al.* 2000).

O estudo genético da biologia de populações deve estar concentrado no uso de marcadores co-dominantes, pois estes fornecem dados mais robustos para as análises quando comparados a marcadores dominantes, que possuem desvantagens técnicas e analíticas (Sunnucks 2000).

Neste trabalho foi utilizado um método mais rápido e rentável de análise de diversidade genética e estrutura populacional de três espécies de peixes: *P. costatus*, *P. lineatus* e *P. argenteus*, utilizando apenas um locus de DNA. Ao analisar-se as amostras de *Prochilodus* spp. dos rios Paraopeba, Pará e Grande, foi constatada uma diversidade genética e uma diferenciação populacional muito significativa. Foi demonstrado que apenas um haplótipo (Hap 1) é compartilhado entre as espécies analisadas, provando-se o alto grau discriminatório do marcador para análises intra-específicas. O marcador de complexas repetições hipervariáveis 2V35 apresentou uma diversidade de microvariantes e é composto por uma seqüência de repetições complexas de CT, o que o torna altamente polimórfico e ideal para estudos genético-populacionais além de ser um forte candidato para análises forenses.



## 6) CONCLUSÕES:

- A utilização da biblioteca genômica primária de *P. lineatus* pertencente ao laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares se mostrou uma metodologia eficiente para o isolamento de novos marcadores moleculares para o gênero.
- Os cinco locais de estudo do rio Paraopeba são de importância fundamental para a conservação e as amostras de *Prochilodus* spp. destes locais devem ser gerenciadas como um grupo que possui diferenças genéticas significativas.
- O monitoramento contínuo de *P. costatus* e *P. argenteus* pós-construção da UHE Retiro Baixo, no rio Paraopeba, será importante para garantir que os planos de gestão implementados na bacia, ligados à conservação e manejo, mantenham a diversidade genética das duas espécies na região.
- Os polimorfismos encontrados no marcador de complexas repetições hipervariáveis 2V35 revelaram a diversidade genética e estrutura populacional de *P. costatus* no rio Pará e o limitado fluxo gênico ao longo do rio causado pela imposição das duas barragens construídas no mesmo (UHE Gafanhoto e UHE Cajurú) resultou em uma contribuição significativa dos programas de repovoamento realizados na região.
- Um monitoramento continuado no rio Pará da espécie e dos programas de repovoamento será importante para garantir a manutenção da diversidade genética das populações de peixes no rio em questão.
- O monitoramento da diversidade genética das matrizes utilizada em programas de repovoamento é necessário para minimizar os efeitos negativos do mesmo.
- O marcador de complexas repetições hipervariáveis 2V35 se mostrou adequado para análise genético-populacionais e diferenciação intra-específica, sendo um forte candidato para análises forenses.

## 7) PERSPECTIVAS:

Neste trabalho, foi possível verificar a variabilidade genética de *Prochilodus* spp. e inferir sobre a estrutura populacional dos mesmos através da análise de seqüenciamento de DNA de tecido sólido (nadadeiras) de peixes coletados nos rios Paraopeba, Pará e Grande, utilizando o marcador molecular 2V35 que se mostrou uma região hipervariável sendo útil para este tipo de análise. Iremos dar continuidade ao estudo genético das matrizes da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG), com o objetivo de determinar a eficácia do repovoamento para o *P. lineatus* na represa de Volta Grande, além de avaliar se as práticas de produção de alevinos de curimatá destinados ao repovoamento em curso na Estação Ambiental de Volta Grande seguem normas de conservação de recursos genéticos.

Para atingirmos tais objetivos, todas as matrizes utilizadas nas safras reprodutivas de 2009 a 2011 estão sendo genotipadas, assim como peixes considerados selvagens coletados no rio Grande antes da soltura dos alevinos oriundos dessas matrizes. Após o repovoamento, será, determinado o perfil genético dos peixes recapturados nas UHEs de Volta Grande e Jaguará, sendo, então, realizada a avaliação dos efeitos do repovoamento na variabilidade genética da população existente nesse reservatório.

Os alevinos de curimatás provenientes de pais geneticamente tipados, estão sendo soltos por dois anos consecutivos no reservatório de Volta Grande. As solturas iniciaram-se em Novembro de 2011 e terminarão em Maio de 2012. O objetivo é a soltura de 220 mil alevinos em cinco pontos determinados no reservatório: Ponto do Acoradouro, Ponto do Ubatã, Ponto de Água Comprida, Ponto de Miguelópolis, Ponto de Porto de Areia.

As campanhas para recaptura são de responsabilidade da equipe do Professor Alexandre Godinho (departamento de zoologia/UFMG) . A primeira campanha para a recaptura dos curimatás soltos no reservatório de Volta Grande será feita na segunda quinzena de Abril 2012. Essa primeira campanha será um piloto para definição das 15 campanhas restantes. Essas serão mensais com duração de 5 dias e/ou bimensais com duração de 9-10 dias.

Após a recaptura, será feita a verificação, através do DNA de cada indivíduo, se ele é proveniente de plantel geneticamente tipado da Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG). O marcador molecular 2V35 será utilizado neste estudo e caso não seja suficiente para a avaliação do repovoamento, os outros 7 marcadores microssatélites isolados (sendo 2 também de complexas repetições hipervariáveis) serão utilizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BioPHP - PHP for bioinformatics, 2008. Disponível *online* em: <[http://biophp.org/minitools/microsatellite\\_repeats\\_finder/demo.php](http://biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php)>. Acesso em: junho de 2008.

CODEVASF - Companhia DE Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba (2012). Institucional. Disponível *online* em: <<http://www.codevasf.gov.br>>, acesso: abril de 2012.

NCBI - National Center for Biotechnology Information, 2008. VecScreen. Disponível *online* em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>>. Acesso: maio de 2008.

Portal Peixe Vivo, 2007. rios de Minas. Disponível *online* em: <<http://www.portalpeixevivo.com.br>>, acesso: março de 2012.>

Agostinho A.A, Vazzoler A.E.A De M, Gomes L.C, Okada E.K (1993). Estratificación y comportamiento de *Prochilodus scrofa* em distintas fases del ciclo de vida, em la planície de inundação del alto rio Paraná y embalse de Itaipu, Paraná, Brasil. Rev. Hydrobiol 26(1): 79-90.

Agostinho A.A. (1994). Pesquisa, monitoramento e manejo da fauna aquática em empreendimentos hidrelétricos. *IN* Seminário sobre a fauna aquática e setor elétrico brasileiro: gerenciamento de bacias hidrográficas e a fauna aquática. Comitê Coordenador das Atividades de Meio Ambiente do Setor Elétrico – COMASE, ELETROBRÁS. rio de Janeiro.

Agostinho A.A.; Gomes, L.C. (1997). Manejo e monitoramento de recursos pesqueiros: perspectivas para o reservatório de Segredo. *In* A. A. Agostinho, L. C. Gomes (Eds.). Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo. EDUEM. Maringá-PR, Brasil, p.319-364

Agostinho A. A.; Julio Junior, H. F. (1999). Peixes da bacia do alto rio Paraná. *IN* R. H. Lowe-McConnell. (Org.). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. EDUSP, São Paulo, p. 374-400.

Agostinho A. A. ; Miranda, L. E. ; Bini, L. M. ; Gomes, L. C. ; Thomaz, S. M. ; Suzuki, H. I.(1999). Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. IN: J. G. Tundisi; M. Straskraba. (Org.). *Theoretical Reservoir Ecology and its applications*. IIE/Backhuys Publishers/Brazilian Academy of Sciences, São Carlos-SP, p. 227-265

Agostinho A. A., Gomes L. C. , Pelicice F. M. (2007). *Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil*. 0. ed. EDUEM , Maringá - Paraná, v. 1, 501 p.

Agostinho A. A., Pelicice F. M., Gomes L. C. (2008). A gestão de recursos pesqueiros em reservatórios no Brasil. *Ação Ambiental (UFV)*, Ano XI:10-18.

Allendorf F. W., Luikart G. (2007). *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell Publishing, Oxford, 623 p.

Alves C.B.M. (1995). Influência da manipulação artificial da época de enchimento na produtividade ictiofaunística em um reservatório de médio porte- UHE Cajurú, rio Pará (MG): uma proposta de manejo. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em ecologia, conservação e manejo da vida silvestre, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 64 p.

Alves C.B.M (2007). Evaluation of fish passage through the Igarapé Dam Fish Ladder. *Neotropical Ichthyology* 5 (2): 233-236.

Amos W., Hoffman J.I., Frodsham A. *et al.* (2007). Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes*. 7:10-14.

Angers B. e Bernatchez L. (1997). Complex evolution of a Salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Molecular Biology and Evolution* 14: 230–238.

Anne C. (2006). Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genética* 127(1-3): 101-120.

Appleyard S.A.; Mather, P.B. (2000) Investigation into the mode of inheritance of allozyme and random amplified polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research* 31: 435 – 445.

Araki H.; Cooper B.; Blouin S. (2007). Genetic effects of captive breeding cause rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science* 318:100-103.

Arantes F.P.; Santos H.B.; Rizzo E.; Sato Y.; Bazzoli N. (2010a). Collapse of the reproductive process of two migratory fish (*Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*) in the Tres Marias Reservoir, Sao Francisco River, Brazil. *Journal of Applied Ichthyology* 1-7.

Arantes F.P.; Santos H.B.; Rizzo E.; Sato Y.; Bazzoli N. (2010b). Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. *Animal Reproduction Science* 118: 330-336.

Armour J.A.L. (2006) Tandemly repeated DNA: Why should anyone care?. *Mutation Research – Fundamentals and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 98:6-14.

Avise J.C. (2004). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, 2nd Edition. Sinauer Associates, Sunderland (Massachusetts), 684 p.

Balding D. J. (2006). *Weight-of-evidence for forensic DNA profiles – statistics in practice*. John Wiley & Sons, 184 p.

Balloux F., Moulin, N. L., (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155-165.

Barbosa A.C.D.L., Galzerani, F. *et al.* (2006) Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Molecular Ecology Notes* 6:936-938.

Barbosa A.C.D.R.; Galzerani, F.; Corrêa, T.C.; Galetti, P.M.; Hatanaka, T.(2008). Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Genetics and Molecular Biology* 31(1):357-360.

Billington (2003). Mitochondrial DNA. IN: Hallerman (Ed.), Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists. *American Fisheries Society*: 59-100.

Bonetto A. A. (1963). Investigaciones sobre migraciones de peces em los rio de La cuenca del Plata. *Ciencia e Investigación* 19 (12): 12-26.

Bonetto A.A. (1986). Fish of the Paraná system. IN: B.R Davies, K.F Walker (Eds.) The ecology of river systems. Springer. 573-588 p.

Bowen S.H. (1983). Detritivory in Neotropical fish communities. *Environmental Biology of Fishes* 9:137-144.

Butler J.M., Hill C.R., Kline M.C., Duewer D.L., Sprecher C.J., McLaren R.S., Rabbach D.R., Krenke B.E., Storts D.R. (2009). The single most polymorphic STR Locus: SE33 performance in U.S. populations. *Forensic Science International: GeneticsSuppl* 2:23-24.

Calabrese P.P., Durrett R.T. e Aquadro C.F. (2001). Dynamics of microsatellite divergence under stepwise mutation and proportional slippage/point mutation models. *Genetics* 159: 839–852.

Caapeleti A.R. e Petreire Jr. M. (2006). Migration of the curimbatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall “Cachoeira de Emas” of the Mogi-Guaçu River - São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 66: 651-659.

Carosfeld J., Harvey B., Ross C., Baer A., (2003). Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. World Fisheries Trust, Victoria, 372 p.

Carvalho D.C. (2002) Identificação e caracterização de regiões microssatélites de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 77p.

Carvalho-Costa L.F. (2006). Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (Teleostei: Characiformes Prochilodontidae) na bacia do rio São Francisco, região de Três Marias (MG). Dissertação de Mestrado, curso de pós-graduação em ecologia e recursos

naturais, departamento de ecologia e recursos naturais, Universidade federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 69 p.

Carvalho G. R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology* 43 (Supplement A): 53-73.

Castro R.M.C. (1990). Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (ostariophysi, Characiformes). Tese de doutorado em ciências-zoologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Castro F. e Begosi A. (1995) Ecology of fishing on the Grande River (Brazil): technology and territorial rights. *Fisheries Research* 21: 361-373.

Castro R.M.C., Vari R.P. (2003). Prochilodontidae (Fannel mouth characiforms. IN: R.E. Reis, S.O. Kullander, C.J. Ferraris Jr. (eds.) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 65-70 p.

CESP (1996). Aspectos limnológicos, ictiológicos e pesqueiros de reservatórios da CESP no período de 1986 a 1994. CESP São Paulo, 81p. (Série Pesquisa e Desenvolvimento, 136).

CETEC (Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais) (1983). Diagnóstico ambiental do Estado de Minas Gerais. Série de publicações técnicas/SPT, 010, 158p.

Chenuil A. (2006). Choosing the right molecular markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genética* 127:101-120.

CURRAN J. L. (1997). Human linkage mapping. IN: R. H. Dear (Ed.) Genome mapping: A practical approachy. Oxford University Press, USA, 1 – 25 p.

Cruz C., Vieira-Silva C., Ribeiro T., Espinheira R. (2006). Genetic data for the locus SE33 in a south Portuguese population with PowerplexR ES System. *International Congress Series* 1288: 427– 429.

Darnell R.M. (1964). Organic detritus in relation to secondary production in aquatic communities. *Stuttgart*, 15:462-470.

Denier K, Garza J.C, Coey R., Gorman D.J. (2007). Population structure and genetic structure of trout (*Onchorynchus mykiss*) above and below natural and man-made barriers in the Russian River, California. *Conservation Genetics* 8: 437-454.

Dergam J. A., Paiva S.R., Schaeffer C. E., Godinho, A. L., Vieira, F. (2002). Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Gen Mol Biol* 25 (4):379-387.

Desalle R. (2005). Genetics at the brink of extinction. *Heredity* 94: 386-387.

Drumond G.M., Martins C.S., Machado A.B.M., Sebaio F.A., Antonini Y. (2005). Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. Fundação Biodiversitas, 222 p.

Ellegren H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435 – 445.

Estoup A., Rousset F., Michalakis Y., Cornuet J. M., Adriamanga M., Guyomard R. (1998). Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology* 7:339 – 353.

Excoffier L. e Lischer H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Ewing, B.; Green, P.(1998). Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research* 8: 186-194.

Ferreira M. E., Grattapaglia D. (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. EMBRAPA – CENARGEN, Brasília.

Ferreira M. E.; Grattapaglia D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3a Ed. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 220 p.

Flecker A.S. (1996). Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology* 77:1845-1854.



- Frankham R. (1996). Relationship of genetic variation to populations size in wildlife. *Conservation Biology* 10:1500-1508.
- Frankham R., Ballou J.D. e Briscoe D.A. (2002). Introduction to conservation genetics, Cambridge University Press, Cambridge, 617 p.
- Frankham R. (2003). Genetics and conservation biology. *Comptes Rendes Biologies* 326:S23 -S29
- Fraser D.J. (2008). How well can captive breeding programs conserve biodiversity? A review of salmonids. *Evolutionary Applications* 1:535-586.
- Futuyma D.J.(1992). Biologia evolutiva. 2a Edicao. Sociedade Brasileira de genetica, Ribeirão Preto. 631 p.
- Garant, D., Fleming, I.A., Einum, S. e Bernatchez, L. (2003) Alternative male life-history tactics as potential vehicles for speeding introgression of farm salmon traits into wild populations. *Ecology Letters* 6:541-549
- Gill P., Kimpton C. P., d'Aloja E., Andersen J. F., Bar W., Brinkmann B., Holgersson S., Johnsson V., Kloosterman A. D., Lareu M. V., Nellemann L., Pfitzinger H., Phillips C. P., Schmitter H., Schneider P.M., Stenersen M. (1994). Report of the European DNA profiling group (EDNAP)--towards standardisation of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Science International* 65: 51–59.
- Godinho H.P., Godinho A.L. (1994). Ecology and conservation of fish in southeastern brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *Acta Limnologica Brasiliensa*, pp.187-197, vol V. Workshop: Brazilian programme on conservation and management on inland water.
- Godinho H.P., Godinho A.L. (Organização)(2003). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Sografe, Belo Horizonte, 458 p.
- Godoy, M.P. (1954). Locais de desova de peixes em um trecho do Mogi Guassu, SP. *Revista Brasileira de Biologia*, 14: 375–96.

Godoy, M.P. (1957). Marcação de peixes no rio Mogi Guassu. *Revista Brasileira de Biologia* 17: 479–90.

Godoy, M.P. (1959). Age, growth, sexual maturity, behaviour, migration, tagging and transplanted of the Curimbata (*Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881) of the Mogi Guassu River, Sao Paulo State, Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 31: p. 447–77.

Godoy, M.P.(1967). Dez anos de observações sobre periodicidade migratória de peixes do rio Mogi Guassu. *Revista Brasileira de Biologia* 27:1–12.

Godoy, M.P. (1972). Brazilian tagging experiments, fishes migration, and upper Paraná River Basin eco-system. *Revista Brasileira de Biologia* 32: 473-484.

Godoy, M.P. (1975). *Peixes do Brasil – subordem Characoidei: bacia do rio Mogi Guassu*. Editora Franciscana, v.1, 216 p.

Gordon D.; Abajian C., Green P. (1998). Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, 8:195-202.

Hallerman E.M. (2003). Population genetics: Principles and practices for fisheries scientists. American Fisheries Society, Bethesda, MD. 458 p.

Hansen M.M., Kenchington, E., Nielsen, E.E. (2001). Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. *Fish and Fisheries* 2: 93-112.

Hatanaka T., Henrique-Silva F., Galletti Jr. P.M. (2002). A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenet. Genome Res.* 98: 308-310.

Hatanaka T. e Galetti Jr. P.M. (2003). RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology* 26: 19-25.

Hatanaka T., Silva F.H. e Galetti Jr. P.M (2006). Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126: 153-159.

Hearne C.M., Ghosh S., Todd J.A. (1992). Microsatellite for linkage analysis of genetic traits. *T.I.G.*, 8: 288-294.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270: 313-321.

Heggenes, J. Roed, K. H. (2006). Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. *Ecology of freshwater fish*, 15: 366 -375.

Hickley P. (1994). Stocking and introduction of fish: a synthesis. IN: I.G. COWX (ed). Reabilitaton of freshwater fisheries. Fishing News Books, Oxford, 247-254 p.

Hilsdorf, A. Krieger, J. E. (1998). Biologia molecular na conservação de peixes. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*, 1(5): 10 - 12.

Jager H.I., Chandler J.A., Lepka K.B., Van Winkle W. (2001). A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. *Environmental Biology Fish* 60:347-361.

Jarne P. e Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*. 11: 424-429.

Jin L., Zhong Y. and Chakraborty R. (1994). The exact numbers of possible microsatellite motifs. *American Journal of Human Genetics* 55:582–583.

Junk W.J., Bayley P.B., Sparks R.E., (1989). The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Canadian Journal of Fishers and Aquatic* 106: 110-127.

Juras I. A. G. M., 2001. Proposição sobre laboratórios de piscicultura em hidrelétricas. Notas técnicas. Brasília: Consultoria Legislativa da Câmara dos Deputados. pp. 5.

Kalinowski S.T. (2004). Genetic polymorphism and mixed-stock fisheries analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquature Sciences* 61: 1075–1082.

Katti M. V., Ranjekar P. K., Gupta V. S. (2001). Differential Distribution of Simple Sequence Repeats in Eukaryotic Genome Sequences. *Molecular. Biological Evolution* 18(7):1161–1167.

Kruglyak S., Durrett R. T., Schug M. D. e Aquadro C. F. (1998) Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 10774–10778.

Lai Y.L. e Sun F.Z. (2003). The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution* 20: 2123-2131.

Larinier M, (2001). Dams, Fish and Fisheries – Opportunities, Challenges and Conflict Resolution. FAO, Roma.

Lászik A., Sótonyi P., Rand S., Hohoff C. (2001). Frequency data for the STR locus ACTBP2 (SE33) in eight populations. *International Journal of Legal Medicine* 115:94-96.

Lenormand T. (2002). Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution* 17(4): 183-189.

Lopes J.M., Bedore A.G. (2008). Peixamento como medida ambiental mitigadora do impacto na ictiofauna. *Ação Ambiental (UFV)*, 39:28-34.

Lowe-McConnell R.H. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes neotropicais. Edusp, São Paulo, 534p.

Ludwig D., Hilborn R., Walters C. (1993). Uncertainty, resource exploitation, and conservation: lesson from history. *Science* 260:17-36.

Lutz G. (2001). Practical Genetics for Aquaculture provides reviews of the fundamental theory and practical applications for genetic improvement in aquaculture. World Aquaculture Society's (WAS), 246 p.

Madeira M.J., Gómez-Moliner B.J., Barbe A.M. (2005). Genetic introgression on freshwater fish populations caused by restocking programmes. *Biol Invasions* 7: 117–125.

Magalhães A.C. (1931). Monographia brasileira de peixes fluviais. Secretaria da Agricultura, indústria e Comércio do Estado de São Paulo, SP.

Maggio T., Lo Brutto S., Garoia F., Tinti F., Arculeo M. (2009). Microsatellite analysis of red *Mullus barbatus* (Perciformes, Mullidae) reveals the isolation of the Adriatic Basin in the Mediterranean Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 66:1883-1891.

Mantel N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.

Martins S.L., Tamada K. (2000). Sistemas para a transposição de peixes (Boletim Técnico da Escola Politécnica da USP, Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, BT/PHD/72). São Paulo: EPUSP.

Matioli S.R.(2001). Biologia Molecular e Evolução. Holos Editora, Ribeirão Preto.

Medeiros E. S. F., Maltchick L. (2001). Fish assemblage stability in an intermittently stream from the Brazilian semiarid region. *Austral Ecology* 26:156–164.

Meffe G.K. (1986). Conservation Genetics and the Management of Endangered Fishes. *Fisheries* 11:14 –23,

Menezes M. P. R. (2005). Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas brasileiras, ibéricas e canárias. Tese (Doutorado integrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará. Paraíba.

Miller L. M., Kapuscinski A. R. (2003). Genetic guidelines for hatchery supplementation programs. IN: E. M. Hallerman,(ed) Population Genetics: Principles and Practices for Fisheries Scientists. American Fisheries Society, Bethesda, 329-355 p.

Miller M.P. (2005). Alleles In Space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, 96: 722–724.

Morita K., Yamamoto S., (2001). Effects of habitat fragmentation by damming on the persistence of stream-dwelling charr populations. *Conservation Biology* 5 (16): 1318-1326.

Moyle, P. B. & Cech Jr. J. J. (1996). *Fishes: an introduction to ichthyology*. 3<sup>a</sup>ed. Printice Hall, New Jersey, 599 p.

Nakatani K., Baumgartner G., Cavicchioli M. (1997). Ecologia de ovos e larvas de peixes. IN: A.E.A.M. Vazzoler, A.A. Agostinho, N.S Hahn (Eds). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. EDUEM, Maringá, 281-306 p.

Nei M., Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Neraas L. P., Spruell P., (2001). Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology* 10: 1153-1164.

Northcote T. G. (1984). Mechanisms Of Fish Migration In Rivers. IN: J. D. Mc-Cleave; G. P. Arnold; J. J. Dodson & W. H. Neill (Eds.) *Mechanisms Of Migration In Fishes*. Plenum Press, New York And London, 317-355 p.

Ovenden, J. R.(1990). Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 41:835-853.

Paiva M.P., Andrade-Tubino M.F., Godoy M.P. (2002). *As represas e os peixes nativos do rio Grande*. Interciência, rio de Janeiro, 78 p.

Paiva, A. L. B. (2007). Isolamento e caracterização de microssatélites de *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes). Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 75 p.

Paiva A. L. B., Kalapothakis E., (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Molecular Ecology Resources* 8: 1078–1080.

Parker, P. G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C., Furerst, P. A., (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79(2): 361-382.

Pavlov D. S.; Lupandin A. I. & Kostin V. V. (2002). Downstream migration of fish through dams of hydroelectric power plants. Russian Academy of Science, Moscow, 249 p.

Pellegrin L.A. (2001). Técnicas de sensoriamento remoto e geoprocessamento aplicadas ao mapeamento do uso do solo: a bacia do rio Pará como exemplo. Dissertação de Mestrado, PUC Minas, Belo Horizonte, 109 p.

Petrere M. (1989). River Fisheries in Brazil: a review. *Regulated Rivers: Research and Management* 4: 1-16.

Petts G. E. (1989). Perspectives for ecological management of regulated rivers. IN: A. Gore; G. E. Petts (ed) Alternatives in regulated river management. CRC Press, Boca Raton, 3-24 p.

Pinto L. M. (2010). Estrutura genética da população brasileira estimada a partir de microssatélites de uso forense. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 157 p.

Poke F. S. *et al.*, (2005). Genomic research in Eucalyptus. *Genética* 125:79-101.

Pompeu P.S., Santos H.A., Alves C.B.M. (2008). Primeiro simpósio de passagens da América do Sul. *Ação Ambiental (UFV)*, 39: 7-9.

Ramella M. S., Kroth M. A., Meurer S., *et al.* (2006). Genetic Variability in Four Fish Species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 589-598.

Reed, D.H. e Frankham, R. (2003) .Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17: 230–237.

Reid T.M., Ingala D.A., Kraemer C.M., Dage W.M., Dieckhoner C., Fortman J., Hodge D.M., Johnson K.L., Oatman C., Schlotman H., Schuh C., Baird M.L. (2003). Distribution of HUMACTBP2 (SE33) alleles in three North American populations. *J Forensic Sci.*, 48(6):1422-3.

Reid S.M., Wilson C.C., Mandrak N.E., Carl L.M. (2008). Population structure and genetic diversity of black redhorse (*Moxostoma duquesnei*) in a highly fragmented watershed. *Conservation Genetics* 9:531-546.

Revaldaves E. e Renesto E. (1997). Genetic Variability Of Prochilodus Lineatus (Characiformes: Prochilodontidae) In The Upper Paraná River. *Brazilian Journal of Genetics* 20: 381-388.

Salvador G.N. (2011). Migração de peixes a jusante da usina hidrelétrica de gafanhoto, localizada no rio Pará, um afluente do São Francisco (Divinópolis, MG). Dissertação de Mestrado, PUCMinas, Belo Horizonte, Minas Gerais, 43 p.

Sunnucks, P. (2000). Efficient tic markers for population biology. *Trends in ecology and evolution* 15:199 – 203.

Rozen, S. e Skaletsky, H. J., 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. IN: Krawetz, S.; Misener, S. (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

Ryynanen H.J., Tonteri A., Vasemagi A. *et al.* (2007). A comparison of biallelic markers and microsatellites for the estimation of population and conservation genetic parameters in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Heredity*, 98(7):692-704.

Salvanes A.G.V. & Braithwaite V. (2006). The need to understand the behaviour of fish reared for mariculture or restocking. *J Mar Sci* 63: 346-354.

Sambrook J., Russell D., (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd Ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 682 p.



Sato Y *et al.* (1996). Hypophysation parameters of the fish *Prochilodus marggravii* obtained in routine hatchery station conditions. *Revista Brasileira de Biologia* 56 (1): 59-64.

Sato Y. e Godinho H.P. (2004). Migratory Fishes of the São Francisco River. IN: J. Carolsfeld *et al.* Migratory Fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. IDRC, Victoria, 380 p.

Sbordoni, V. (1986) Length variation in mtDNA control region in hatchery stocks of European sea bass subjected to acclimation experiments. *Genetics Selection Evolution* 30: 275-288.

Schlötterer, C. e Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 211–215.

Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109(6): 365-371.

Schlötterer C. (2004). The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nat Rev Gen* 5: 63-69.

Schwartzman A.S., Nascimento N.O., Sperling M.V. (2002). Outorga e cobrança pelo uso de recursos hídricos: aplicação à bacia do rio Paraopeba, MG. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos* 7: 103-122.

Silva, L.G.M. (2004). Migração de mandis-amarelos *Pimelodus maculatus* e curimbas *Prochilodus lineatus* no rio Grande, bacia do Alto Paraná. Dissertação de mestrado, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 73p.

Sivasundar A., Bermingham E., Ortí G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American Rivers. *Molecular Ecology* 10:407-418.

Stoeckle M. (2003). Taxonomy, DNA and the bar code of life. *Bioscience* 53: 2-3. Sunnucks P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-203.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

Taylor, E. B. Stamford. M. D. Baxter, J. S., (2003). Population subdivision in westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) at the northern periphery of its range: evolutionary inferences and conservation implications. *Molecular Ecology* 12: 2609- 2622.

Thorpe, J. P., Sole-Cava, A. M., Watts, P. C. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420:165-184. 2000.

Tundisi, J. G.; Tundisi, T.M. Limnologia. São Paulo: Oficina de Textos, 2008.

Tundisi J.G. (1987). Ecologia, limnologia e aspectos socioeconômicos da construção de hidrelétricas nos trópicos. IN: Anais do encontro de tropicologia 4: 47-85. Também disponível na biblioteca virtual de tropicologia. Disponível em: <[http://www.tropicologia.org.br/conferencia/1987ecologia/\\_limnologia.html](http://www.tropicologia.org.br/conferencia/1987ecologia/_limnologia.html)>.

Urquhart A., Kimpton C.P., Gill P. (1993). Sequence variability of the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2) locus. *Human Genetics*, 92 (6):637-638.

Urquhart A., Kimpton C.P., Downes T.J. and Gill P. (1994). Variation in short tandem repeat sequences – A survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International Journal of Legal Medicine*, 107:13–20.

Utter F.M. (2003). Genetic impacts of fish introductions. IN: Hallerman (ed), Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists. American Fisheries Society, 357-378 p.

Vazzoler A. E. A. M.; Lizama M. A. P.; Inada P. (1997). Influências ambientais sobre a sazonalidade reprodutiva. IN: A. E. A. M. Vazzoler; A. A. Agostinho; N. S Hahn, E. N. S. (ed). A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. EDUEM, Maringá, 267-280p.

Vieira F., Pompeu P.S. (2001). Peixamento: uma alternativa eficiente. *Ciência Hoje* 30(175): 28-33.

Vrijenhoek R. C., (1998). Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology* 53 (Supplement A): 394 - 412.

Waples R.S., Winans G.A., Utter F.M. e Mahnken C. (1990) Genetic approaches to the management of Pacific salmon. *Fisheries* 15: 19–25.

Ward R. D., Sole-Cava A.M., Russo C.A.M., Thorpe J.P.(2000) Genetics in fisheries management. IN: Marine Genetics (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 191-201 p.

Welcomme R.L. (1979). Fisheries ecology of floodplain rivers. Logman Group Limited, London, 316 p.

Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M. Jr., Gyllenstein U.B., Helm-Bychowsky K.M., Higuchi R.G., Palumbi S.R., Prager E.M., Sage R.D. e Stoneking M. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol J Linn Soc* 26: 375-400.

Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, 15:323-354.

Yazbeck, G. M. (1997). Microsatélites em estudos populacionais de peixes migratórios. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 139 p.

Yazbeck G.M. & Kalapothakis E. (2007). Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Research*, 6 (4):1026-1034.

Zane L., Barceloni L., Patarnello T., (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review.  
*Molecular ecology* 11: 1-16.

## ANEXOS

**Anexo 1:** Exemplo da Tabela de controle das matrizes de *P. lineatus* referente à reprodução da segunda semana de novembro de 2010.

**Tabela 1:** Matrizes da EAVG que foram microchipadas com suas respectivas origens, destinos e procedimentos realizados para a genotipagem das mesmas. Trabalho realizado em parceria com o Programa Peixe Vivo/CEMIG.

DATA	ESPÉCIE	SEXO	MICROCHIP	TANQUE DE ORIGEM / DESTINO MATRIZES	CÓDIGO EPENDORF	EXTRAÇÃO DE DNA PARA BANCO GENÉTICO	SUCESSO REPRODUTIVO
10/11/10	<i>P. lineatus</i>	MACHO	985121023147642	Porto Colômbia/ Tanque O6 - Tanque O4	126	+	+
10/11/10	<i>P. lineatus</i>	FÊMEA	985121022547378	Porto Colômbia/ Tanque O6 - Tanque O4	127	+	+
10/11/10	<i>P. lineatus</i>	MACHO	985121023138464	Porto Colômbia/ Tanque O6 - Tanque O4	128	+	+
10/11/10	<i>P. lineatus</i>	FÊMEA	985121022552678	Porto Colômbia/ Tanque O6 - Tanque O4	129	+	+
10/11/10	<i>P. lineatus</i>	FÊMEA	985121022718711	Porto Colômbia/ Tanque O6 - Tanque O4	130	+	-
10/11/10	<i>P. lineatus</i>	MACHO	985121022558348	Porto Colômbia/ Tanque O6 - Tanque O4	131	+	-
10/11/10	<i>P. lineatus</i>	FÊMEA	985121022556050	Porto Colômbia/ Tanque O6 - Tanque O4	132	+	+

**Anexo 2: Artigos aceitos pelas revistas: *Open Journal of genetics* e *Genetics and Molecular Research***

## Genetic diversity and population structure of *Prochilodus costatus* and *Prochilodus argenteus* preceding dam construction in the Paraopeba River, São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil

Tatiana M. Barroca<sup>1</sup>, Fábio P. Arantes<sup>2</sup>, Bárbara F. Magalhães<sup>1</sup>, Flávia F. Siqueira<sup>1</sup>,  
Carolina C. R. Horta<sup>1</sup>, Isabella F. Pena<sup>1</sup>, Jorge A. Dergam<sup>3</sup>, Evanguedes Kalapothakis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Animal, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

Email: [ekalapo@icb.ufmg.br](mailto:ekalapo@icb.ufmg.br)

Received 24 March 2012; revised 30 April 2012; accepted 22 May 2012

### ABSTRACT

Curimatã-pioia (*Prochilodus costatus*) and curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*) are migratory fish species endemic to the São Francisco River Basin in Brazil. Both species play important roles in local fisheries and ecology in the Paraopeba River. A dam was recently constructed on this river and to help in the development and conservation programs, we characterized the genetic variation of both species before dam construction. Complex hypervariable repeats microsatellite was used to assess genetic variation for both species within and between the five collection sites in order to detect population substructuring. Nucleotide substitutions and insertion/deletion polymorphisms (indels) resulted in 35 *P. costatus* haplotypes (sample size = 89) and 22 *P. argenteus* haplotypes (sample size = 32). Significant genetic diversity and population differentiation was detected between five sampling sites for both species. Therefore, each of the five sites should be regarded as a group comprising significant genetic differences in species conservation and maintenance plans. Comparing these results to genetic diversity measures after dam construction will be critical for future management in this region.

**Keywords:** Freshwater Fish;  
Complex Hypervariable Repeats Microsatellite;  
Genetic Diversity; Population Structure

### 1. INTRODUCTION

In South American rivers, *Prochilodus* species are conspicuous, abundant, and widely distributed freshwater fish [1]. They support important fisheries in many parts

of the continent. In the lower stretches and flood plain lagoons of the Paraná basin, *Prochilodus* spp. constitute to 50% - 90% of the total fish biomass. In the Jupia reservoir in the Paraná River, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) present significant results in commercial fisheries [2-4]. *Prochilodus* spp. has high fecundity and spawn all eggs at once in the open waters of the main river channel. Larvae drift passively towards flooded areas where they feed. Juveniles remain on the floodplain for approximately two years before they mature [5]. *Prochilodus costatus* Valenciennes known as curimatã-pioia and *Prochilodus argenteus* Agassiz known as curimatã-pacu are endemic to the São Francisco River Basin in Brazil. Within the river, these benthopelagic, detritivorous species play a critical role in cycling organic material [6-8]. As a result, these species must be considered in reproductive management and conservation programs in this basin.

One of the most important tributaries of the São Francisco River is the 510-km long Paraopeba River in Minas Gerais State, southeastern Brazil [9]. The majority (51%) of species endemic to the São Francisco River Basin are present in the Paraopeba River [10]. However, in the Paraopeba River, these species are threatened by human activities, such as mining, discharge of industrial effluents and domestic sewage, overfishing, destruction of gallery forests, and the draining of wetlands in support of agricultural development [10]. The Paraopeba River has two older dams in its upper section [11] (Igarapé Thermoelectric Dam and Salto do Paraopeba) and a third one built in 2010 in its lower section (Retiro Baixo Hydroelectric Dam; Figure 1).

Molecular markers have enabled large-scale population genetics analyses [12] that address important questions in population biology. Assessing genetic variation



1 **Genetic diversity and population structure of a commercially important**  
2 **freshwater fish (*Prochilodus costatus*) using complex hypervariable repeats**

3  
4 T. M. Barroca<sup>1</sup>; G. B. Santos<sup>2</sup>; N. V. R. Duarte<sup>2</sup>; E. Kalapothakis<sup>1</sup>

5  
6 1- Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade  
7 Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

8  
9 2- Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados, Pontifícia Universidade  
10 Católica de Minas Gerais - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

11  
12 **Running Title**

13 Genetic diversity & structure in *Prochilodus costatus*

14  
15 **Keywords**

16 Freshwater fish, *Prochilodus costatus*, Complex hypervariable repeats, 2V35, genetic  
17 diversity, population genetic structure, hatchery program, Pará River, São Francisco  
18 Basin.

19  
20 **Correspondence:** Prof. Evanguedes Kalapothakis, Fax: +55 31 3409-2713, E-mail:  
21 ekalapo@icb.ufmg.br, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências  
22 Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – Av. Antônio Carlos, 6627 -  
23 31.270-901 - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51 **Abstract**

52 We used complex hypervariable repeats to evaluate the genetic diversity and  
53 structure of *Prochilodus costatus* (Characiformes), an ecologically and economically  
54 important species endemic from the São Francisco River Basin. Hydroelectric dams  
55 along the River have led to fragmentation, which can limit gene flow. Restocking  
56 programs from hatcheries have been used to supplement declining population sizes. To  
57 determine how fragmentation and hatchery supplementation affect *P. costatus*  
58 population structure, we studied populations from three sites upstream and downstream  
59 the Gafanhoto Dam (Pará River, State of Minas Gerais). High levels of genetic diversity  
60 were found within populations ranged from 0.926 to 0.873, and the three populations  
61 showed significant differentiation ( $F_{st}=0.16$ ), suggesting that populations from the three  
62 sites were affected by the fragmentation of the River and the hatchery activity. These  
63 results can be used to develop a management and conservation plan for fish species in  
64 this area.

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101 **Introduction**

102 *Prochilodus* species are among the most conspicuous, abundant and widely distributed  
103 freshwater fish in South American Rivers. These species are important for commercial  
104 and subsistence freshwater fishing in many parts of the continent, where in some  
105 regions they constitute 50-90% of the total fish biomass (Welcomme, 1979; Bowen,  
106 1983; Bonetto, 1986; Sivasundar, 2000). During the high rainy season, most of these  
107 fishes migrate long-distances upstream to the spawning areas close to the headwaters.  
108 They spawn all eggs at once in the open waters of the main River channel and larvae  
109 drift passively towards flooded areas (Agostinho *et al.*, 1993). In Brazil, the São  
110 Francisco River Basin provides habitat for 152 fish species, including the highly  
111 abundant and ecologically and economically important *P. costatus* (Valenciennes 1850),  
112 known locally as curimatá-pioa ( Sato and Godinho, 2003). This long distance  
113 migratory species plays an important ecological role by cycling organic material and an  
114 important economic role in artisanal and commercial fishing communities (Flecker  
115 1996; Camargo and Petrere Jr 2001). As a result, *P. costatus* should be a focus of  
116 reproductive management and conservation programs in this region.  
117 Over the past century, increasing demands for electric power has led to dam and  
118 reservoir construction on many South American Rivers. This construction also disrupts  
119 the natural River ecosystems (Petrere, 1996). For migratory fish species, dam and  
120 reservoir construction can change population genetics by splitting populations and  
121 isolating previously connected populations. This change in gene flow can reduce the  
122 fitness of the population and increase its risk of extinction (Neraas and Spruell, 2001;  
123 Frankham *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2008). One of the São Francisco River's most  
124 important tributaries, the Pará River, has had two hydroelectric dams (Gafanhoto and  
125 Cajuru) since the 1940s (Figure 1). Since 1983, *P. costatus* restocking programs have  
126 aimed to reduce the environmental impacts of the dams on the Pará River.  
127 Molecular markers are a powerful tool used to study genetic diversity and population  
128 differentiation (Avice, 1987). One of the most commonly used molecular markers in  
129 population studies is microsatellites or short tandem repeats (STRs) (Vrijenhoek, 1998;  
130 Zane, 2002; Yazbeck and Kalapothakis, 2007; Barbosa *et al.*, 2008; Paiva and  
131 Kalapothakis, 2008; Hsu *et al.*, 2011). STRs are often divided into several categories  
132 based on the repeat pattern. Complex hypervariable repeats are highly polymorphic in  
133 natural populations and have many alleles that differ with respect to both length and  
134 sequence. These hypervariable markers can be used alone in population studies  
135 (Urquhart *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 1994; Reid *et al.*, 2003; Butler *et al.*, 2009).  
136 To characterize the standing genetic variation and population structure of *P. costatus* in  
137 three sites on the Pará River, we investigated genetic differentiation using complex  
138 hypervariable repeats. The data can be used as a baseline in future studies that  
139 investigate how the restocking program affects the composition, structure, and life cycle  
140 of local fish species. In addition, these data can contribute to the development of  
141 conservation management programs for these fish.

142

143 **Material and Methods**

144 *Sample collection*

145 We collected 45 adult *P. costatus* in the Pará River (Minas Gerais, Brazil) from October  
146 2006 to February 2007. Specimens were collected from three distinct sites (Figure 1;  
147 Table 1): site I was immediately downstream of the Gafanhoto Dam, site II was  
148 between the Gafanhoto and Cajuru Dams, and site III was upstream Cajuru Dam. From  
149 each specimen, we sampled 1 cm<sup>2</sup> of caudal fin.

150 *DNA extraction, amplification, and analysis of the 2V35 locus*

151 The Complex Hypervariable Repeat 2V35 was isolated from a primary genomic library  
152 of *Prochilodus lineatus*, which was constructed from genomic DNA extracted from  
153 muscle tissue (Yazbeck and Kalapothakis, 2007) using the proteinase K-phenol-  
154 chloroform method (Sambrook *et al.*, 2001).

155 Genomic DNA was isolated from each sample by digestion with proteinase K at 37°C  
156 overnight, followed by standard phenol/chloroform extraction (Sambrook *et al.*, 2001).  
157 The complex hypervariable repeat 2V35 was amplified from all 45 specimens by nested  
158 polymerase chain reaction (PCR) using the primers: F1 5'-TAA TGA TTC TCT TTG  
159 CTT GTG TC-3', R1 5'-GCA GAC CCC TCA GCA C-3', F2 5'-TCT TTG CTT GTG  
160 TCT TG-3' and R2 5'-AAG GCC TGA AAT ACA GTG CA-3'. Each nested  
161 polymerase chain reaction (PCR) had a total volume of 25 µL, containing 20-50 ng of  
162 genomic DNA (first round) or 0.5 ng of PCR product (second round), 5 pM of each  
163 primer (F1/R1 first round or F2/R2 second round), and a pre-mix containing PCR  
164 buffer, dNTPs, and *Taq* DNA polymerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços, Belo  
165 Horizonte, Brazil). The first round had the following cycling conditions: an initial  
166 denaturation at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s,  
167 primer annealing at 54°C for 30 s, and extension at 72°C for 40 s, and ending with a  
168 final extension step at 72°C for 5 min. The second PCR round had similar cycling  
169 conditions except that the annealing temperature was 51°C. PCR products (8 µL) were  
170 visualized on a 2% agarose gel and selected for direct sequence. PCR products were  
171 sequenced bi-directionally using primers F2 and R2 and the BigDye Terminator v3.1  
172 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA)  
173 following the manufacturer's protocol on an ABI 3130 Genetic Analyser.

#### 174 *Statistical analysis*

175 Genetic variation at the intra-population level indices, such as gene diversity, nucleotide  
176 diversity, number of observed transitions, transversions, and indels, and the number of  
177 haplotypes shared among populations was measured in Arlequin 3.5.1 (Excoffier and  
178 Lischer, 2010).

179 The genetic structure of population was assessed using hierarchical analyses of  
180 molecular variance (AMOVA) (Excoffier and Lischer, 2010), which was conducted by  
181 imposing three different clusters and one population group. The source of variation was  
182 calculated with respect to partitioning the molecular variance among populations and  
183 within populations. Population differentiation was analyzed using Wright's  $F_{st}$  (Wright,  
184 1951).

#### 185 *Isolation by distance*

186 Isolation by distance was evaluated by testing the correlation between the genetic and  
187 geographic distance matrices with a Mantel test (Mantel, 1967) using 1,000  
188 permutations and logarithmic transformations of both distance measures in the program  
189 Alleles in Space (Miller, 2005).

#### 190 *Phylogenetic analysis*

191 Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007).  
192 The phylogenetic tree was built with a neighbour-joining algorithm (Saitou and Nei,  
193 1987), using the p-distance method (Nei and Kumar, 2000) and assuming uniform  
194 evolutionary rates. The confidence of the resulting topology was estimated by  
195 bootstrapping (10,000 replicates).

196

## 197 **Results**

### 198 *Diversity indices*

199 The complex hypervariable repeat 2V35 amplified approximately 461 bp in all 45  
200 specimens, showing 25-44 substitutions and 5-20 indels resulted in 25 unique *P*.

201 *costatus* haplotypes (Table 2). Most haplotypes were found only at a single site and few  
202 haplotypes were shared. Site III shared Hap 1 and Hap 10 with site I, and Hap 16 and  
203 Hap 19 with site II.

204 Transitions, transversions, and indels in 2V35 and overall diversity indices are given in  
205 Table 3 for the species. Genetic diversity was highest (0.9264) at site I in the Pará River  
206 population (site I) followed by site III upstream Cajurú Dam (0.8874), and lowest at site  
207 II between Gafanhoto and Cajuru Dams (0.8736).

#### 208 *Population differentiation and structure*

209 This species showed significant population differentiation at 2V35. The *P. costatus*  
210 populations had a mean  $F_{st}$  of 0.16727. The AMOVA results revealed that 83.27% of  
211 genetic variation ( $P < 0.05$ ) resided within populations (Table 4). Pairwise  $F_{st}$  values  
212 ranged from 0.090–0.230 and were significant in all comparisons ( $P < 0.05$ ) (Table 5).

#### 213 *Isolation by distance*

214 Significant isolation by distance was observed for *P. costatus* populations (Figure 2;  $r =$   
215 0.196;  $P < 0.001$ ).

#### 216 *Phylogenetic Analysis*

217 Phylogenetic reconstruction of 2V35 sequences from *P. costatus* revealed three strongly  
218 supported clusters supported by bootstrap values of higher than 80% (Figure 3).

219

## 220 **Discussion**

221 We characterized the genetic diversity and population structure for *P. costatus*, an  
222 important endemic fish species of the São Francisco Basin in the Pará River. The  
223 molecular marker 2V35 was highly variable across populations with 25 unique  
224 haplotypes from three sites in the River. 2V35 had no sequence similarity to known  
225 proteins (BlastX data not shown) and its high level of polymorphism suggested that  
226 2V35 is a non-coding, neutrally evolving nuclear marker (Urquhart *et al.*, 1993;  
227 Schlötterer, 2000; Zane *et al.*, 2002; Ellegren, 2004; Chenuil, 2006).

228 Fragmentation of freshwater fish populations by dams may reduce gene flow between  
229 populations leading to lower genetic diversity within populations and significant genetic  
230 differentiation among fish populations (; Jager *et al.*, 2001; Neraas and Spruell, 2001).

231 Alternatively, no differences may be found between the genetic diversity of above-and  
232 below-dams populations (Neraas & Spruell 2001; Denier *et al.* 2007). In the present  
233 study, *P. costatus* had high levels of genetic diversity within and between populations.

234 The differences in genetic diversity among Pará River *P. costatus* populations could be  
235 the result of the absence of migration caused by the dams, the restocking of hatchery for  
236 over 20 years, and the length of the River fragment. These factors could act

237 independently or together in shaping the population structure of *P. costatus*. The limited  
238 number of 2V35 haplotypes shared between populations and the significant isolation by  
239 distance suggest that there has been little to no gene flow across the two dams for more

240 than 6 decades (Santos and Sato, 2012 personal communication). Hatchery programs  
241 are widely used for the restoration of declining natural populations. In Brazil, such  
242 programs have been in place since the 1970s to restore fish populations and maintain or

243 increase fisheries production (Madeira *et al.*, 2005; Agostinho *et al.* 2007; Araki *et al.*  
244 2007; Fraser 2008;). Captive breeding programs that use local wild fish as broodstock  
245 are expected to produce hatchery fish with minimal differences in fitness from wild fish

246 (Araki *et al.*, 2007). The highly significant genetic differentiation between populations  
247 suggests that the Hydrobiology and Pisciculture Station of Três Marias from the  
248 Development Company of São Francisco and Parnaíba River (CODEVASF) have

249 successfully implemented this local approach to generate broodstock. In these captive

250 breeding programs, distinct groups of hatchery fishes are released separately in the three  
251 sites (Santos and Sato, 2012 personal communication).  
252 The genetic structure of populations in fragmented Rivers may change faster than in  
253 populations that inhabit in uninterrupted Rivers (Reid *et al.*, 2008). In the present study,  
254 sites II and III are in short River fragments and likely significantly affected by  
255 fragmentation. As a migratory fish, *P. costatus* populations at these two sites cannot  
256 reproduce because of the reduced fragment size and absence of natural conditions for  
257 recruitment like spawning areas and floods.  
258 Among the three sampling sites, site I was least affected by dams, hatcheries, and River  
259 fragmentation. The hatchery fish from site I were in contact with wild populations from  
260 downstream of the Gafanhoto dam, and there are natural conditions for recruitment  
261 (Santos and Sato, 2012 personal communication). By contrast, site II was in a short  
262 River fragment with barriers to gene flow at both ends and a small population size. Site  
263 III was of intermediate length and population size compared to sites I and II. The  
264 observed genetic diversity and structure of the populations at sites II and III is  
265 dependent on the genetics of the hatchery fish.  
266 Variation at the complex hypervariable repeat 2V35 revealed genetic diversity and  
267 structure of *P. costatus* populations. Limited gene-flow along the Pará River cause by  
268 multiple hydroelectric dams has resulted in large contributions of local population  
269 genetic diversity from hatchery stocks. Continued monitoring of this species and the  
270 hatchery supplementation activity will be important to ensure the maintenance of  
271 genetic diversity in fish populations across the São Francisco Basin in the Pará River.  
272

#### 273 **Data Accessibility**

274 DNA sequence: Genbank accession number BankIt1469324 Seq1 JN403076  
275

#### 276 **Acknowledgments**

277 We thank the biologists Yoshimi Sato and Gilberto Nepomuceno Salvador for the  
278 technical support and comments. This research was funded by Fundação de Amparo à  
279 Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de  
280 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento  
281 de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Dr. E. Kalapothakis is a recipient of a CNPq  
282 fellowship.  
283

#### 284 **References**

- 285 Agostinho AA, Vazzoler AEA de M, Gomes LC, Okada EK (1993) Estratificación y  
286 comportamiento de *Prochilodus scrofa* em distintas fases del ciclo de vida, em la  
287 planície de inundação del alto rio Paraná y embalse de Itaipu, Paraná, Brasil. *Rev.*  
288 *Hydrobiol*, 26(1): 79-90.  
289 Agostinho AA., Gomes LC, Pelicice FM (2007). Ecologia e manejo de recursos  
290 pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá: Eduem.  
291 Araki H, Cooper B, Blouin S (2007). Genetic effects of captive breeding cause rapid,  
292 cumulative fitness decline in the wild. *Science*, 318: 100-103.  
293 Avise JC (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between  
294 population genetics and systematic. *Annu Rev Ecol and Syst*, 18: 489-522..  
295 Barbosa ACDR, Galzerani F, Corrêa TC, Galetti JR PM, *et al.* (2008) Description of  
296 novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-  
297 amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Genet Mol Biol*, 31(1): 357-360.  
298 Bowen SH (1983) Detritivory in Neotropical fish communities. *Environmental Biology*  
299 *of Fishes*, 9: 137-144.

300 Bonetto AA (1986). Fish of the Paraná system. In: The ecology of River systems (eds  
301 Davies BR, Walker KF). Dr W. Junk, Dordrecht, The Netherlands, 573-588.

302 Butler JM, Hill CR, Kline MC, Duewer DL, *et al.* (2009). The single most polymorphic  
303 STR Locus: SE33 performance in U.S. populations. *Forensic Sci Int: Genetics Suppl.*  
304 Ser. 2: 23-24.

305 Camargo SAF and Petrere Jr M (2001). Social and financial aspects of the artisanal  
306 fisheries of Middle São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. *Fish Manage Ecol*, 8:  
307 163-171.

308 Chenuil A (2006). Choosing the right molecular markers for studying biodiversity: from  
309 molecular evolution to practical aspects. *Genetica*, 127: 101-120.

310 Denier K, Garza JC, Coey R, Gorman DJ (2007). Population structure and genetic  
311 structure of trout (*Onchorynchus mykiss*) above and below natural and man-made  
312 barriers in the Russian River, California. *Conserv Genet*, 8: 437-454.

313 Ellegren H (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev*  
314 *Genet*, 5: 435 – 445.

315 Excoffier L and Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs  
316 to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*,  
317 10:564-567.

318 Flecker AS (1996) Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse  
319 tropical stream. *Ecology*, 77: 1845-1854.

320 Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2004) A primer of conservation genetics.  
321 Cambridge University Press, Cambridge.

322 Fraser DJ (2008) How well can captive breeding programs conserve biodiversity? A  
323 review of salmonids. *Evol Appl*, 1-52.

324 Gill P, Kimpton C P, d' Aloja E, Andersen J F, *et al.* (1994) *Forensic Sci Int*, 65: 51–59.

325 Hsu TH, Guillén Madrid AG, Burrige CP, Cheng HY, *et al.* (2011). Resolution of the  
326 *Acanthopagrus* black seabream complex based on mitochondrial and amplified  
327 fragment-length polymorphism analyses. *J Fish Biol.* doi: 10.1111/j.1095-  
328 8649.2011.03100.x.

329 Jager HI, Chandler JA, Lepla KB, Van Winkle W (2001) A theoretical study of River  
330 fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. *Environmental*  
331 *Biology Fish*, 60: 347-361.

332 Madeira MJ, Gómez-Moliner BJ, Barbe AM (2005). Genetic introgression on  
333 freshwater fish populations caused by restocking programmes. *Biol Invasions*, 7:  
334 117–125.

335 Mantel N (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression  
336 approach. *Cancer Res*, 27:209-220.

337 Miller MP (2005) Alleles In Space (ais): computer software for the joint analysis of  
338 interindividual spatial and genetic information. *J Hered*, 96: 722–724.

339 Neraas LP and Spruell P (2001) Fragmentation of Riverine systems: the genetic effects  
340 of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Mol*  
341 *Ecol*, 10: 1153-1164.

342 Nei M, Kumar S (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University  
343 Press, New York.

344 Paiva ALB, Kalapothakis E (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci  
345 in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Mol Ecol Resour*, 8:1078-1080.

346 Petrere M Jr (1996). Fisheries in large tropical reservoirs in South America. *Lake &*  
347 *Reservoirs: Res Manage*, 2: 111–133.

- 348 Reid TM, Ingala DA, Kraemer CM, Dage WM, *et al.*(2003) Distribution of  
 349 HUMACTBP2 (SE33) alleles in three North American populations. *J Forensic Sci.*,  
 350 48(6):1422-3.
- 351 Reid SM, Wilson CC, Mandrak NE, Carl LM (2008) Population structure and genetic  
 352 diversity of black redhorse (*Moxostoma duquesnei*) in a highly fragmented  
 353 watershed. *Conserv Genet*, 9:531-546.
- 354 Saitou N, Nei M (1987) The neighbour-joining method: A new method for  
 355 reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406-425.
- 356 Sambrook J, Russell D (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd Ed. Cold  
 357 Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 682.
- 358 Sato Y, Godinho HP (2003). Migratory fishes of the São Francisco River. In: Migratory  
 359 fishes of South America: biology, fisheries and conservation status, Carolsfeld J,  
 360 Harvey B, Ross C, Baer A (eds.). World Fisheries Trust: Victoria, BC, Canada; 195-  
 361 232.
- 362 Schlötterer C (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*,  
 363 109(6): 365-371.
- 364 Sivasundar A, Bermingham E, Ortí G (2000). Population structure and biogeography of  
 365 migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American  
 366 Rivers. *Mol Ecol*, 10: 407-417.
- 367 Tamura K, Dudley J, Nei M *et al.* (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics  
 368 Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24: 1596-1599.
- 369 Urquhart A, Kimpton CP, Gill P (1993) Sequence variability of the tetranucleotide  
 370 repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2) locus.  
 371 *Hum Genet*, 92 (6): 637-638.
- 372 Vrijenhoek RC (1998). Conservation genetics of freshwater fish. *J Fish Biol*, 53  
 373 (Supplement A): 394 – 412.
- 374 Welcomme RL (1979). Fisheries ecology of floodplain Rivers. London: Logman Group  
 375 Limited. 316.
- 376 Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, 15: 323-354.
- 377 Yazbeck GM and Kalapothakis E (2007) Isolation and characterization of microsatellite  
 378 DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genet Mol Res*, 6  
 379 (4): 1026-1034.
- 380 Zane L, Barceloni L, Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: a  
 381 review. *Mol ecol*, 11: 1-16.

382

### 383 **Figure Captions**

384 Figure 1. Map of the collection sites in the Pará River Basin. Site I: Downstream  
 385 Gafanhoto Dam; Site II: Site between Gafanhoto and Cajuru Dams; Site III: Upstream  
 386 Cajurú Dam.

387

388 Figure 2. Isolation by distance for *P. costatus* ( $r = 0.196$ ,  $P < 0.001$ ) calculated using  
 389 Alleles in Space (Miller 2005).

390

391 Figure 3. Phylogenetic tree constructed by the NJ algorithm based on 25 haplotypes of  
 392 the complex hypervariable repeat 2V25 in *P. costatus*. Numbers next to branches  
 393 indicate bootstrap support 10,000 replicates. Three clusters are evident.

394

395



1 **Tables**

2 Table 1. Sites and geographic coordinates of the collected *Prochilodus costatus* in the Pará river basin. All fishes were collected from 2006 to  
3 2007.

Species	Sites	Geographic Coordinates
<i>P. costatus</i>	Downstream Gafanhoto Dam	20° 05' 58" S - 44° 50' 56" W
<i>P. costatus</i>	Site between Gafanhoto and Cajuru Dams	20° 14' 17" S - 44° 45' 13" W
<i>P. costatus</i>	Upstream Cajurú Dam	20° 15' 05" S - 44° 45' 16" W

4 Sample sizes: 15

5 Table 2. Substitutions and indels in 2V35 haplotypes for *P. costatus*

Haplotype s	Collected sites	Polymorphic sites																																						
		27	28	30	36	41	48	53	55	57	58	59	64	65	66	68	69	70	71	72	79	83	102	103	104	107	108	109	110	111	116	117	125	129	132	135	139	148		
Hap1	I, III	-	-	T	T	T	C	C	-	C	C	T	T	C	C	A	C	T	C	C	C	C	T	T	T	C	T	C	-	C	C	T	T	C	A	C	C			
Hap2	I	T	C	.	.	.	T	.	-	.	.	.	G	A	A	T	C	G	A	T	.	.	A	C	C	-	-	C	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap3	I	-	-	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	T	T	.	.	.	.	T	T	.	.		
Hap4	I	T	T	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	C	C	-	-	C	T	C	.	T	.	.	.	.	.	.		
Hap5	I	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	-	-	C	T	T	T	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap6	I	T	C	.	.	.	T	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	-	C	T	C	G	.	.	C	T	T	.	T	.	T
Hap7	I	-	-	.	C	.	T	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	-	C	T	C	G	.	.	.	.	T	T	.	T	
Hap8	I	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	C	T	T	T	.	.	.	.	T	T	.	.		
Hap9	I	-	-	.	.	.	T	.	-	G	G	G	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	A	A	A	A	A	G	.	.	.	.	T	T	.	T		
Hap10	I, III	T	C	.	.	.	T	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	-	-	-	-	G	.	.	.	T	T	.	T	.	T	
Hap11	I	T	C	.	.	.	.	G	-	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	C	C	-	-	C	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap12	I	T	C	.	.	.	T	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	-	C	T	C	G	.	.	.	.	T	T	.	T	.	T
Hap13	III	T	C	.	.	.	T	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	T	T	.	T	.	T	
Hap14	III	T	T	C	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	C	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap15	III	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap16	II, III	-	-	.	C	.	T	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G	.	.	.	.	T	T	.	T	.	T
Hap17	III	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap18	III	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	T	T	.	.	
Hap19	II, III	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	T	T	A	.	.
Hap20	II	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap21	II	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	T	T	.	.	.
Hap22	II	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	C	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap23	II	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	T	T	.	.	.
Hap24	II	-	-	.	.	C	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	T	.	.	.	.	T	T	.	.	.	
Hap25	II	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

6

Haplotypes	Collected sites	Polymorphic sites																													
		160	193	201	234	241	243	271	275	290	293	325	336	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	364	372	378	384	407
Hap1	I, III	T	T	C	C	T	T	T	T	G	T	C	C	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	T	C	T	T	G	C	C	A
Hap2	I	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap3	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap4	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap5	I	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap6	I	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	T
Hap7	I	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap8	I	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap9	I	A	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap10	I, III	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	T
Hap11	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap12	I	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	T
Hap13	III	.	C	T	T	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	T
Hap14	III	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap15	III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T
Hap16	II, III	.	.	T	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap17	III	.	.	T	T	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T
Hap18	III	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap19	II, III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap20	II	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Hap21	II	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T
Hap22	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T
Hap23	II	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T
Hap24	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	T
Hap25	II	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.

7

8

9

10

11

12

13 Table 3. Diversity indices at 2V35 in *P. costatus*.

	Sampling localities		
	I	II	III
<b><i>P. costatus</i></b>			
Substitution	44	25	27
Transition	24	19	20
Transversion	20	6	7
Indels	20	5	19
h	12	8	9
H	0.9264	0.8736	0.8874
$\pi$	0.042471	0.017420	0.035805

14 The diversity indices includes mutations by transitions, transversions and insertion/deletion polymorphisms (indels); number of haplotypes for  
 15 sampling localities (h); gene diversity (H); nucleotide diversity ( $\pi$ ). Sample sizes = 15.  
 16

17 Table 4. Population differentiation for *P. costatus* in the Pará River.

Sample clustering	Source of variation	Degrees of freedom	Variance components	Variation (%)	Fixation indices
<i>Prochilodus costatus</i>	Among populations	2	1.47218 Va	16.73	$F_{st}= 0.16727$
	Within populations	87	7.32912 Vb	83.27	

18 \* $P < 0.05$   
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26

27 Table 5. Pair-wise  $F_{st}$  values in *P. costatus* individuals among the three sampled sites.

	I	II	III
I		0.00000	0.01040
II	0.23024 *		0.00000
III	0.09031*	0.19351*	

28 Pairwise  $F_{st}$  estimates are presented below the diagonal and  $P$  values are above the diagonal.

29 \* $P < 0.05$

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

# Figures

## Figure 1

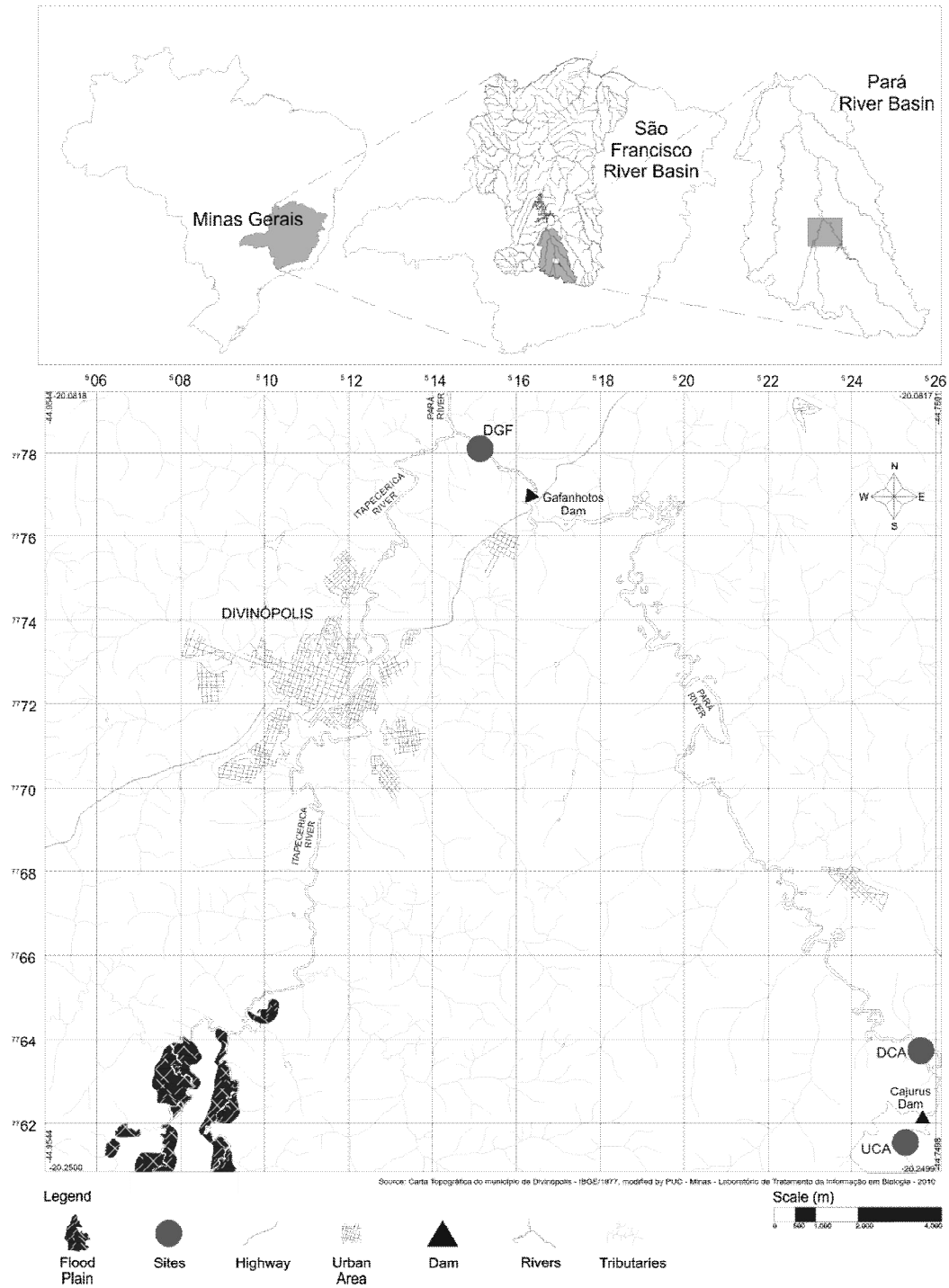


Figure 2

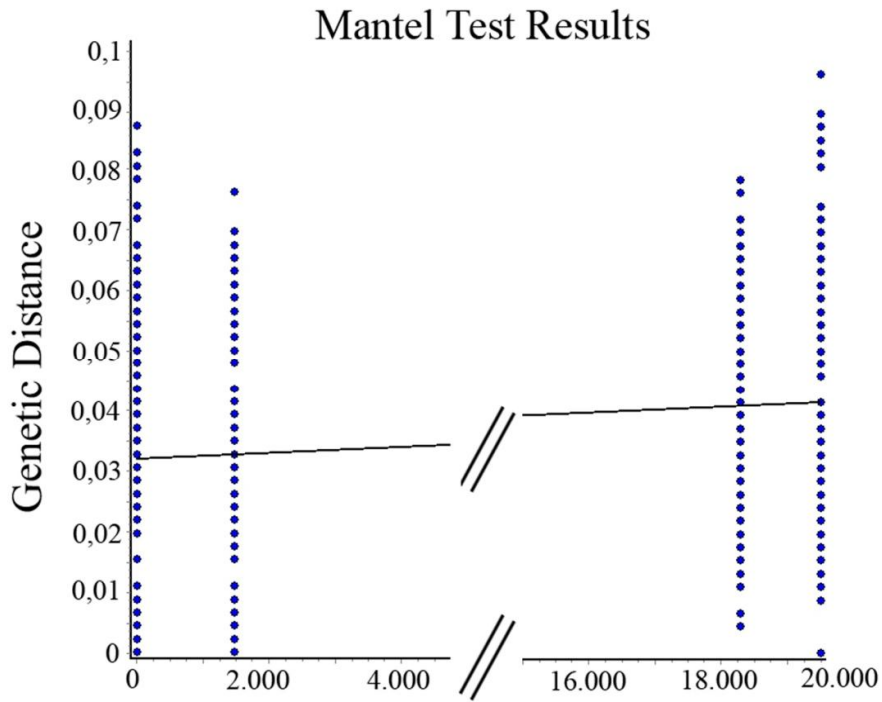


Figure 3

