



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MESTRADO EM GENÉTICA**

Avaliação da diversidade genética de *Prochilodus lineatus*
(Valenciennes 1836) no Rio Claro, Goiás Brasil.

**Goiânia
2021**

HÉRIDA SAMAYA GONÇALVES DE SOUSA

Avaliação da diversidade genética de *Prochilodus lineatus*
(Valenciennes 1836) no Rio Claro, Goiás Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética (MGene) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Alex Silva da Cruz
Coorientadora: Dra. Flávia de Melo Rodrigues

Goiânia
2021



**PUC
GOIÁS**



ANEXO DA ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS.

Discente: **Hérica Samaya Gonçalves de Sousa**

Título da Dissertação **Avaliação da diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (valenciennes 1836) no Rio Claro, Goiás-Brasil**

Data do exame: 31 de maio de 2021, às 18h30min

Correções; modificações; alterações; comentários; observações; pontos para reformulação etc. (Assinatura obrigatória).

Prof. Dr. Alex Silva da Cruz (Membro Presidente) | **Assinatura** Alex Silva da Cruz
Assinale em caso afirmativo: [] O exemplar lido para o exame foi entregue ao discente com as correções necessárias.

Observações adicionais (Opcional):

Seguir as orientações de correções encaminhadas pela banca avaliadora

Profa. Dra. Flávia Melo Rodrigues (Co-Orientador) | **Assinatura** Flávia Melo Rodrigues
Assinale em caso afirmativo: [] O exemplar lido para o exame foi entregue ao discente com as correções necessárias.

Observações adicionais (Opcional):

Seguir as orientações de correções encaminhadas pela banca avaliadora

Profa. Dra. Wanessa Fernandes Carvalho (Membro Convidado Externo) | **Assinatura:** Wanessa Fernandes Carvalho
Assinale em caso afirmativo: [] O exemplar lido para o exame foi entregue ao discente com as correções necessárias.

Observações adicionais (Opcional):

Estudante foi aprovada sem reformulação.

S725a Sousa, Herida Samaya Gonçalves de
Avaliação da diversidade genética de *Prochilodus lineatus*
(Valenciennes 1836) no Rio Claro, Goiás Brasil / Herida
Samaya Gonçalves de Sousa.-- 2021.

48 f.: il.

Texto em português, com resumo em inglês
Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade
Católica de Goiás, Escola de Ciências Agrárias e Biológicas,
Goiânia, 2021

Inclui referências: f. 40-45

1. Estruturas hidráulicas. 2. Genética - Pesquisa.
3. Peixes - Goiás (Estado). I.Cruz, Alex Silva da.
II.Rodrigues, Flávia Melo. III.Pontifícia Universidade
Católica de Goiás - Programa de Pós-Graduação em Genética
- 2021. IV. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 575(043)

Agradecimento

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que me foi concedido ao longo de minha vida, em especial á minha família. Minha mãe Dina Pereira Gonçalves de Sousa, meu pai Itamar Batista de Sousa e minha irmã Nágilla Layara Gonçalves de Sousa, sou grata por todo amor e apoio. Por sempre me incentivarem a tentar ser uma pessoa melhor a cada dia, pois esta, sem dúvidas foi a base essencial para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Obrigada por tudo, vocês três são as pessoas que eu mais amo nesse mundo!

As minhas amigas Larissa Resende Carvalho, Jakeline Soares Fortes e Sara Romana Dias Dionísio, obrigada por toda contribuição no desenvolvimento deste estudo e por todos os momentos que passamos juntas desde a graduação. A Sabrina Sara Moreira Duarte palavras são insuficientes para expressar a quão grata sou por ter você como amiga, obrigada por sempre acreditar em mim, até mesmo quando eu não acreditei. Da mesma forma ao Daniel Ferreira por toda contribuição apoio e amizade, vocês são muito importantes na minha vida, só desejo que nossa amizade seja eterna. Não menos importante, agradeço também ao Victor Cortázio, Júlia Woch e Rafaela Mendes. Eu amo vocês demais!

A Elza Uchoa, Oximano, Leticia Claudino, Adriana Guerra, Maria Amorelli e Jakeline Soares obrigada por todo conhecimento compartilhado e por todos os momentos que passamos durante essa trajetória, juntos compusemos a melhor turma MGene (turma MGene 2019).

Sou grata aos excelentes professores Aparecido Divino da Cruz, Cláudio Carlos da Silva, Lysa Bernardes Minasi, Emília Oliveira, Thaís Cidália Vieira Gigonzag, Marc Alexandre Duarte Gigonzag, Mariana Pires e toda equipe docente do MGene. Em especial agradeço o meu orientador Alex Silva da Cruz, pessoa na qual tive a oportunidade de conhecer em 2014, saiba que sou bastante grata por todas as oportunidades que me concedeu ao longo desses anos, obrigada também por sempre incentivar, acreditar e confiar em mim. Mais recentemente, já no início do mestrado, tive oportunidade de conhecer minha co-orientadora Flavia Melo Rodrigues, obrigada por ser sempre essa pessoa tão maravilhosa, saiba que sou muito grata por toda contribuição e por ter sido sempre tão atenciosa comigo.

Durante o desenvolvimento desse estudo no Núcleo de Pesquisas Replicon, agradeço ao Eduardo Rocha pela companhia bem-humorada de todas as manhãs, ao Marcos Milk por ser tão amável e pelas companhias de almoço juntamente com a Alessandra Malta que sempre foi muito atenciosa e solícita. A Damiana da Cunha, sou grata pela amizade ao longo desses anos, pessoa na qual eu tenho um carinho enorme, obrigada por sempre me incentivar a seguir em frente e acreditar em mim.

Quanto aos colegas do Núcleo de Pesquisas Replicon agradeço a Samara Socorro, Jallys, Gabriel Mihahira, Calebe, Lucas, Lorryne Guimaraes, Gustavo Dib, Raissa, Juliana, João Manso, Nygell, Irene, Cristiano, Maria, Rafael Carneiro e Sarah Amado, com vocês os dias são mais leves! Agradeço também Aliane e Rafael Braga pela contribuição, a Emília Oliveira Alves Costa e Wanessa Fernandes Carvalho por aceitarem compor a banca examinadora. E a Florencia Gonçalves por todo incentivo e amizade.

A instituição de fomento Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) e ao Laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) pelo fornecimento dos insumos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente com este estudo.

Sumário

TABELAS E FIGURAS	XII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1- INTRODUÇÃO.....	14
2- REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 ECOSISTEMAS DE ÁGUA DOCE.....	16
2.2 IMPACTOS DAS USINAS HIDROELÉTRICAS NOS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS	16
2.3 FAMÍLIA PROCHILODONTÍDAE	17
2.4 PROCHILODUS LINEATUS	18
2.5 MARCADORES MOLECULARES.....	20
2.6 MICROSSATELITES	21
2.7 GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO	23
2.8 ESTUDOS DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM PEIXES NEOTROPICAIS	24
3- OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4- MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS DA COLETA DE DADOS.....	27
4.2 POPULAÇÕES E AMOSTRAS.....	27
4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	30
4.4 AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES	31
4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	31
4.6 ELETROFORESE.....	32
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6- CONCLUSÃO	40

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
8- APENDICES	46
8.1 GRÁFICO DE FREQUÊNCIA ALÉLICA POR LOCO OBTIDAS EM TRÊS POPULAÇÕES DE <i>P. LINEATUS</i> ATRAVÉS DE CINCO LOCOS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES.	46
9- ANEXOS	47
9.1 LICENÇA PARA MONITORAMENTO DA FAUNA.....	47

Tabelas

Tabela 1. Classificação dos microssatélites quanto ao número de nucleotídeos por repetição. (Fonte: Kalia et al., 2011; Miah et al., 2013, com adaptação). _____	22
Tabela 2. Classificação dos microssatélites quanto aos tipos de arranjo nucleotídeos por motivo. (Adapado de Kalia et al., 2011; Miah et al., 2013). _____	22
Tabela 3. Descrição das populações utilizadas no estudo e seus respectivos pontos de coleta, coordenadas geográficas na calha principal do rio claro, coletados entre os anos de 2012 e 2014. _____	28
Tabela 4. Populações utilizadas no estudo com seus respectivos pontos de coleta e número de indivíduos. _____	28
Tabela 5. Reagentes utilizados na extração de DNA e suas respectivas quantidades para cada amostra. _____	30
Tabela 6. Identificação e características dos primers utilizados no estudo. _____	31
Tabela 7. Protocolo PCR para indivíduo da espécie <i>Prochilodus lineatus</i> utilizado no estudo. _____	32
Tabela 8. Número de alelos por loco. _____	34
Tabela 9. Número de alelos por população. _____	35
Tabela 10. Descrição dos 8 alelos privados encontrados em suas respectivas populações, loco, tamanho de alelo e frequência. _____	35
Tabela 11. Resultado das estatísticas descritivas dos cinco locos de marcadores microssatélites avaliados nas três populações de <i>P. lineatus</i> . _____	36
Tabela 12. Estatísticas descritivas das 3 populações de <i>P. lineatus</i> . _____	37

Figuras

Figura 1. Imagem representativa de um espécime de <i>Prochilodus lineatus</i> , fonte FishBase (FROESE; PAULY 2019). _____	19
Figura 2. Representação esquemática de alelos que contém sequência de microssatélite e variações quanto ao número de repetições entre os indivíduos. A projeção de primers para amplificação por PCR em regiões flangeadoras únicas permite a identificação das diferenças nos números de repetições do microssatélite encontrado em cada indivíduo.	

Indivíduos 1, 2 e 3 são homozigotos e individuo 4 é heterozigoto. (Fonte: adaptado de Turchetto-Zolet et al., 2017). _____ 23

Figura 3. Distribuição geográfica do Rio Claro no município de Caçu, bacia do Paraná Goiás, Brasil, evidenciando os pontos de coleta adotados no estudo (fonte: Sousa 2021). 29

Figura 4. Delta K estimados com os dados dos cinco loci microssatélite, 63 indivíduos, pertencentes as três populações _____ 38

Figura 5. Dendograma baseado nos coeficientes de similaridade de nei (1978) para as populações de *Prochilodus lineatus*. Correlação cofenética do dendrograma: 0,999 ____ 39

Resumo

A energia hidrelétrica é a forma mais utilizada de energia renovável e contribui significativamente para geração de energia global, sendo frequentemente considerada como fonte de energia limpa devido a diminuição da poluição dos efluentes. Entretanto as barragens de usinas hidroelétricas impossibilitam o fluxo natural do rio afetando todo o ecossistema local, especialmente espécies que migram para fins reprodutivos. Conhecer a diversidade genética das populações é importante para desenvolver ações de conservação que visam reduzir o risco de extinção. Diante desse cenário, esse estudo tem como objetivo fazer uma análise da diversidade genética existente em populações de *Prochilodus lineatus*, do Rio Claro, na cidade de Caçu (Goiás, Brasil), com o uso de marcadores moleculares microssatélites. Um total de 63 espécimes foram coletados no período de 2012 a 2014, em cinco pontos distribuídos ao longo da calha principal do Rio Claro, na cidade de Caçu, Goiás, Brasil, subdivididos em três populações (A, B e C) de acordo com as barreiras presentes no rio. Esses indivíduos foram analisados com cinco locos de marcadores moleculares microssatélites. Para análise da medida de exclusão de paternidade e probabilidade de identidade, foram encontrados os valores $Q = 0,999$ e $PI = 9,507 \times 10^{-11}$, indicando que os cinco locos utilizados no estudo são eficientes para estudos genéticos populacionais, pois foram capazes de discriminar os indivíduos. Em média foram identificados 15 alelos por loco. A média populacional da heterozigosidade observada (0,5378) se apresentou abaixo da média populacional da heterozigosidade esperada (0,9176), com presença de endogamia resultante do sistema reprodutivo F_{IS} (0,4625). O valor de F_{ST} foi baixo (0,016), porém, foi significativo ($p \leq 0,05\%$), indicando uma subdivisão populacional que corroborou com os resultados da análise bayesiana que evidenciou dois grupos genéticos ao verificar a análise de divergência genética. Um grupo é a população (A e B) e o outro grupo é a população (C). No entanto, existe fluxo gênico entre as populações A e B, e a população C está isolada geneticamente, possivelmente, pelo fato de estar localizada entre duas barreiras antrópicas. As populações apresentaram uma baixa diversidade genética e elevada endogamia, podendo estar relacionada com a subdivisão populacional encontrada no rio. Este estudo foi importante para indicar aos programas de conservação que a espécie *P. lineatus* pode estar possivelmente sofrendo impactos causados pelas barreiras presentes no curso do Rio Claro.

Palavras-Chave: barragens. genética da conservação. marcadores microssatélites. peixes.

Abstract

Hydroelectric energy is the most used source of renewable energy which contributes significantly to the generation of global energy, and it is also often considered as a source of clean energy due to the reduction of effluent pollution. However, the dams of hydroelectric plants prevent the natural flow of the river which affects the entire local ecosystem, especially the species that migrate for reproductive purposes. Knowing the genetic diversity of populations is important to develop conservation actions that aim to reduce the risk of extinction. Because of the present scenery, this study aims to make an analysis of the genetic diversity using microsatellite molecular markers of the populations of *Prochilodus lineatus* from Rio Claro in the city of Caçu (Goiás, Brazil). Overall, 63 specimens were collected at five points distributed along the main channel of the Rio Claro from 2012 to 2014. The specimens were subdivided into three populations (A, B and C) according to the barriers present in the river. These individuals were analyzed using five loci of microsatellite molecular marker. The analysis of the measure of exclusion of paternity and likelihood of identity, the values $Q = 0.999$ and $PI = 9.507 \times 10^{-11}$ were found, indicating that the five loci performed in the study are efficient for population genetic studies, because they were able to discriminate between individuals. On average, 15 alleles were identified per locus. The population average of the observed heterozygosity (0.5378) was below the population average of the expected heterozygosity (0.9176), with the presence of inbreeding resulting from the reproductive system F_{is} (0.4625). The F_{st} value was low (0.016), therefore, it was significant ($p \leq 0.05\%$), indicating a population subdivision, corroborating with the results of the Bayesian analysis that showed two genetic groups, when verifying the analysis of genetic divergence. The first group is the population (A and B) and the other group is the population (C). However, there is a gene flow between populations A and B, on the other hand, the population C is genetically isolated, possibly due to the fact that it is located between two anthropic barriers. The populations presented a low genetic diversity and high inbreeding, which may be related to the population subdivision found in the river. This study was important to indicate to conservation programs that the species *P. lineatus* may be possibly suffering impacts caused by the barriers present in the course of Clear river.

Keywords: Dams. Conservation. microsatellite markers. Fish.

1- INTRODUÇÃO

Devido ao aumento demográfico, a quantidade de centrais hidrelétricas de pequeno e grande porte vem aumentando de forma progressiva. Cerca de 66,8% da energia elétrica brasileira é oriundo de fontes hidrelétricas, os benefícios sociais e econômicos dessas construções são explícitos, entretanto os impactos ambientais são severos. As barragens consiste em uma barreira física que influencia no padrão de migração de diversas espécies (MARTELETO, 2015).

Nos ecossistemas de água doce habitam um terço das espécies de vertebrados. Em todo o mundo, ambientes de água doce vem se tornando os ecossistemas mais ameaçados e estão entre as principais prioridades de conservação, com altas taxas de perda de espécies substancialmente mais altas que em ambientes terrestres CAMPOS-SILVA; PERES, (2016). De acordo com a World Conservation União (IUCN) 15% das espécies de peixes estão em ameaça de extinção (FRANKHAM, 2018).

Na atualidade, a construção de barragens pode ser considerada uma das principais causas da redução populacional de peixes em diferentes regiões do mundo. Esse tipo de mudança no habitat interfere na migração do peixe impossibilitando-o de se reproduzir no ciclo e na qualidade da água. Outro impacto gerado pelas barreiras físicas é o isolamento das populações que antes se encontravam (MARTINS et al., 2011).

A espécie *Prochilodus lineatus* (valencienes 1836) é considerada um dos elementos mais importantes da pesca comercial nos rios neotropicais em ambientes Sul-Americanos. Apresenta comportamento migratório e sua reprodução ocorre em canais de rios e o deslocamento inicial ocorre em lagos marginais próximo as várzeas (MACHADO; FORESTI, 2012; VOLTOLIN et al., 2013).

Segundo o autor NAZIR; KHAN, (2017), o maior obstáculo para conservação de peixes de água doce é a falta de planos de manejo e exigência de áreas protegidas. As estratégias de gestão não são realizadas para maioria das espécies em todo o mundo, e quando realizadas, as estratégias são específicas para o tipo de corpos de água e não para as populações de peixes.

Um conjunto de pressões seletivas influenciam sob a frequência dos genes, podendo acarretar endogamia, produzindo alterações genéticas que podem ser menos viáveis para sobrevivência do organismo. Nesse sentido é fundamental o estudo intra e

interpopulacional para verificar os processos evolutivos das espécies (WAGNER; HILSDORF; ORFÃO, 2011).

Diante deste cenário, é de suma importância o desenvolvimento de estudos genéticos para avaliar a adaptação das espécies, sua evolução em resposta as mudanças ambientais afim de orientar programas de conservação LOPERA-BARRERO et al., (2019). Nesse sentido, este estudo visa verificar a variabilidade genética em populações de espécie *Prochilodus lineatus* em um trecho na calha do Rio Claro, em Caçu, Goiás Brasil.

2- REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ecossistemas de água doce

O Brasil possui aproximadamente 12% dos recursos hídricos mundiais, detém alta biodiversidade e endemismo. Entretanto, ações antrópicas vêm submetendo os ecossistemas aquáticos a diversos impactos ambientais, ameaçando a integridade ecológica do meio. Alterações hidrológicas, alterações biológicas, assoreamento e contaminação são algumas das principais ações humanas que prejudicam o meio aquático. Interferindo diretamente na qualidade da água e na biodiversidade da fauna local (MARTINS et al. 2014).

Nesse sentido, o desenvolvimento de uma série de estratégias de conservação em diferentes regiões brasileiras e criação de áreas protegidas vem representando um avanço para as políticas de conservação. Estudos indicam que projetos voltados para biodiversidade aquática em unidades de conservação estão limitados, e é visto o declínio de peixes migratórios, uma vez que esses peixes necessitam de grande área para completar seu ciclo reprodutivo, isso expõe a necessidade da criação de mais áreas protegidas para manter a dinâmica populacional de espécies (AZEVEDO-SANTOS et al. 2019).

2.2 Impactos das usinas hidroelétricas nos ecossistemas aquáticos

A água bem gerenciada, pode transformar ambientes que podem se tornar próprios, e ao mesmo tempo impróprios para sobrevivência, tendo em vista o modo de gerenciamento. Rios neotropicais são exemplos de ecossistemas que recebem impactos indiretos e diretos, originados pelas ações antrópicas (DE SOUZA; AZEVEDO, 2020).

Com o crescimento demográfico e o desenvolvimento econômico, a instalação de hidrelétricas vem sendo a alternativa mais visada atualmente quando a questão é o fornecimento de energia elétrica. Centrais hidrelétricas são consideradas uma opção sustentável e renovável para o fornecimento de energia. Entretanto muitos estudos vem enfatizando os impactos das usinas hidrelétricas sobre a fauna aquática (RUOCCO; PORTINHO; NOGUEIRA, 2019).

Mudanças nas condições hidráulicas, traz importantes degradações ambientais que não devem ser desconsideradas. Afetam de forma significativa a diversidade biótica nos sistemas aquáticos, reduz a qualidade da água, diminui o oxigênio, gera o aumento de doenças de veiculação hídrica, dificulta a livre circulação de espécies migratórias devido a fragmentação do habitat, reduz os locais de desova e reprodução afetando diretamente na diversidade da população (MORETTO et al, 2012; OVIEDO-OCAÑA, 2018).

No Brasil, a construção de barragens para produção de energia elétrica, é um dos principais impactos antrópicos nas bacias hidrográficas, modificando substancialmente a maioria dos grandes cursos de água natural do país SOUZA-CRUZ-BUENAGA et al., (2019). Afetam o desempenho de natação de peixes migratórios, que podem aumentar o tempo de viagem e diminuir significativamente o sucesso reprodutivo das espécies por meio da chegada tardia aos locais de desova ou aumento da mortalidade em rota impedindo-os de completar seu ciclo reprodutivo (LOPES et al. 2019).

Segundo o estudo de VAN TREECK et al. (2021) independente do tamanho, as usinas hidroelétricas geram impactos sob os peixes, suas represas fragmentam rios causando alterações nos regimes de fluxo e transporte de sedimentos, resultando na perda de habitats adequados para espécies ribeirinhas e ameaçam a migração de várias espécies, isso coloca a produção de hidroeletricidade em conflito com os esforços para proteger espécies ameaçadas. A avaliação do impacto das usinas hidroelétricas sob os peixes é importante na tomada de decisão durante o planejamento e operações das usinas.

2.3 Família Prochilodontidae

A família Prochilodontidae faz parte da ordem Characiforme, e, atualmente são reconhecidas vinte e uma espécies FRABLE et al., (2016). Estão distribuídas em três gêneros distintos: a) *Ichthyoelephas*, distribuído nos rios a oeste dos Andes na Colômbia e Equador. B) *Semaprochilodus* pode ser encontrado a leste de os Andes pelas bacias do Orinoco, Amazonas, Tocantins e alguns rios que drenam o escudo da Guiana. C) *Prochilodus*, distribuído nas principais regiões da América do Sul (MELO et al. 2016).

Grande parte dos prochilodontídeos possuem corpos grandes, alta fecundidade e representam cerca de 50 a 80% da biomassa capturada pela pesca comercial nas regiões de sua área de distribuição. Além disso, alguns membros possuem características benéficas para piscicultura como o rápido crescimento, rápido aumento de peso, alto valor econômico

e manejo rústico. São dentritivos e migratários, desempenham um importante papel na cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos através da ciclagem de nutrientes, equilíbrio, distribuição e manutenção dos fluxos energéticos e sustentam uma ampla rede trófica para um grande número de predadores (LANDÍNEZ-GARCÍA; NARVÁEZ; MÁRQUEZ, 2020).

2.4 *Prochilodus lineatus*

Espécimes *Prochilodus lineatus* são popularmente conhecido como curimba, curimbatá, gumatã ou papa-terra LOPERA-BARRERO et al. (2016). Distribuídos principalmente na bacia do Paraná, Uruguai e Paraguai. Sendo constantemente explorados pela pesca comercial, principalmente na Argentina, Bolívia, Uruguai e Paraguai e Brasil. No Rio Paraná, cerca de 10.000 toneladas de peixes de água doce são desembarcadas por ano, nos quais os *P. lineatus* representam 95% da biomassa representando um dos recursos de água doce mais importantes da América do Sul. Possuem alta fertilidade e falta de cuidado parental (RIBOLLI et al. 2020).

Possuem tamanho corporal relativamente grande, lábios carnudos, palpebra pouco desenvolvida, múltiplos dentes, com duas fileiras em cada mandíbula, todos os dentes com tamanho semelhantes e implantados na carne que recobre a mandíbula. Linhas horizontais de escamas, barbatana dorsal truncada, barbatana peitoral pontiaguda, barbatana caudal bifurcada, ponta da nadadeira peitoral e pélvica comprimida. Coloração prateada, com um pouco de pigmentação vermelha na parte lateral do corpo, região da cabeça e parte dorsal escura, barbatana caudal escura, barbatana dorsal hialina e barbatana peitoral e anal pouco avermelhada (Figura 1). Citogeneticamente são diplóides e apresentam cromossomos do tipo metacêntrico e submetacêntrico (CASTRO; VARI, 2004).

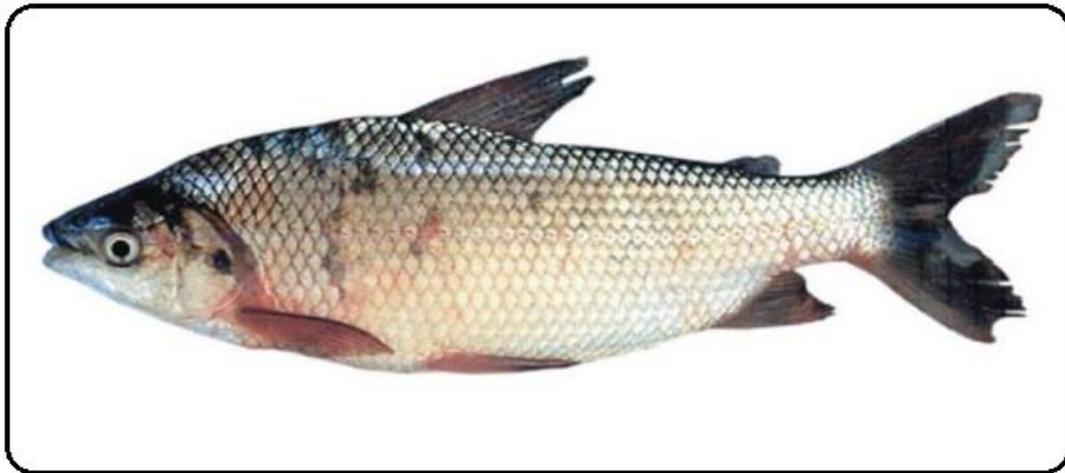


Figura 1. Imagem representativa de um espécime de *Prochilodus lineatus*, fonte FishBase (FROESE; PAULY 2019).

São dentritívoras e bentopelágicas, exerce um papel importante na ciclagem de material orgânico nas bacias onde ocorrem e são considerados migradores de longa distância. LOPES et al. (2019). São potamódromos, e durante a estação de chuva a espécie migra para encontrar água limpa e realizar a desova. Esse hábito é chamado de piracema, e ocorre quando o ambiente é adequado para estimular a reprodução dos peixes (DI CHIACCHIO et al., 2017).

Na bacia do rio Paraná as migrações anuais da espécie começam de agosto/setembro, coincidindo com as primeiras chuvas e aumento de temperatura. Em um ciclo migratório completo são percorridos de montante a jusante cerca de 1.200 á 1.400 km, essa distância pode estar possivelmente relacionada a necessidade biológica de nadar, um dos fatores que condicionam a maturação das gônadas e desencadeia o evento reprodutivo (CAPELETI; PETRERE, 2006).

Possui grande fertilidade e desova total: as fêmeas realizam desova em um curto período de tempo e não são liberados mais ovos nesse período de reprodução, que ocorre anualmente durante os meses chuvosos e quentes. À medida que ocorre a migração em águas correntes para trechos superiores de grandes afluentes, os ovos fertilizados deslocam na corrente do rio para planícies aluviais enquanto completam o desenvolvimento (BARRETO et al., 2020).

Crescimento rápido com tamanho de comprimento predominantemente entre 30 e 40 cm, o tempo de vida normalmente varia entre três e seis anos. Os espécimes juvenis são frequentemente encontrados em lagoas marginais do canal principal do rio, enquanto os adultos preferem ambientes lóticos. Esses habitats podem representar até 80% da biomassa (PESOA; SCHULZ, 2010).

2.5 Marcadores moleculares

No século XIX, Gregor Mendel realizou experimentos genéticos baseados em marcadores fenotípicos, mais longe, marcadores genéticos morfológicos com *drosophila* trouxe a teoria da ligação genética. Com o avanço de novas técnicas de biologia molecular veio o desenvolvimento de marcadores moleculares tornando possível a manipulação de DNA em laboratório (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

Os marcadores moleculares fornecem informações sobre variações alélicas em um determinado locus permitindo a diferenciação entre indivíduos, podem ser classificados de acordo com o tipo de herança alélica, sendo codominantes ou dominantes. Os marcadores dominantes permitem identificar somente a presença ou ausência de um determinado alelo, enquanto os codominantes permitem diferenciar alelos heterozigotos e homozigotos (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017)

Os diferentes tipos de marcadores também se distinguem quanto a metodologia a ser utilizada para verificar a variabilidade a nível de DNA. Os principais marcadores moleculares podem ser classificados em três grupos conforme sua metodologia, que são baseados em hibridização, sequenciamento ou amplificação (MILACH, 1998).

Um exemplo de marcador baseado em hibridização é o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). No grupo de marcadores por amplificação podemos citar AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), ISSR (Inter-simple sequence repeats), SSR (Simple Sequence Repeats) MILACH, (1998) A utilização dos marcadores por amplificação baseia-se na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com essa técnica ocorre uma replicação *in vitro* de segmentos específicos de DNA, resultando em milhares de cópias da sequência de interesse, fornecendo quantidade suficiente para a visualização do DNA (FERREIRA et al., 2009).

O progresso das Técnicas moleculares nas últimas décadas permitiu um melhor entendimento na relação taxonômica, evolutiva e demográfica de plantas e animais. Com subsidio na compreensão da diversidade genética de espécies ameaçadas de extinção e fornecendo suporte na identificação de áreas prioritárias em programas de conservação ROSA, (2010). A existência de vários tipos de marcadores, diferenças na metodologia, princípios e aplicações, requer uma cuidadosa atenção na escolha do método, bem como recursos financeiros e disponibilidade de equipamentos no centro de pesquisa Turchetto-Zolet et al. (2017). Cada marcador molecular tem suas vantagens e limitações, cabe ao

pesquisador selecionar o marcador que mais atende suas necessidades (O'HANLON; PEAKALL; BRIESE, 2000).

2.6 Microssatélites

No campo da genética da conservação, a proteção da biodiversidade é importante para evitar extinção de espécies ameaçadas. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares a análise genética tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada nas pesquisas de conservação OLIVEIRA et al., (2006). Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites vêm se destacando nos estudos de genética populacional. Dada sua natureza codominante, são variáveis e muito informativos devido seu alto grau polimórfico e alto poder estatístico por loco obtido através da genotipagem (PIMENTEL et al., 2018; SENAN et al., 2014).

Microssatélites, também conhecidos como repetições curtas em tandem (STR), Polimorfismos de comprimento de sequências simples (SSLP) ou repetições de sequências simples (SSR). São subcategorias de repetições denominadas motivo, que constitui em pequenas sequências de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. (VIEIRA et al., 2016). Na (Figura 2) é possível observar as variações quanto ao número de repetições.

Em relação a quantidade de nucleotídeo por unidade de repetição, os SSRs podem ser classificados como mononucleotídeo, dinucleotídeo, trinucleotídeo, tetranucleotídeo pentanucleotídeo ou hexanucleotídeo (Tabela 1). Com base no arranjo dentro do motivo repetido, eles podem ser classificados como a) simples perfeito: quando a sequência não é interrompida. B) simples imperfeito: quando a sequência é interrompida por um par de nucleotídeos. C) composta: quando é formado por duas sequências de nucleotídeos distintas D) interrompido: quando a sequência é interrompida por uma pequena sequência de nucleotídeos (Tabela 2). Essas regiões de SSR podem ser encontrados no genoma nuclear (nuSSRs), mitocondrial (mtSSRs) e cloroplastidial (clSSRs) (KALIA et al., 2011; MIAH et al., 2013) .

Tabela 1. Classificação dos microssatélites quanto ao número de nucleotídeos por repetição (Fonte: Kalia et al., 2011; Miah et al., 2013, com adaptação).

Tipo de repetição	Nucleotídeo	Exemplo
Mononucleotídeo	(G) _n	GGG
Dinucleotídeo	(CG) _n	CGCGCG
Trinucleotídeo	(GCA) _n	GCAGCAGCA
Tetranucleotídeo	(GCAT) _n	GCATGCATGCAT
Pentanucleotídeo	(GCATC) _n	GCATCGCATCGCATC
Hexanucleotídeo	(GCATCG) _n	GCATCGGCATCGGCATCG

n= Número de variáveis

Tabela 2. Classificação dos microssatélites quanto aos tipos de arranjo nucleotídeos por motivo (Adapado de Kalia et al., 2011; Miah et al., 2013).

Nome do arranjo	Tipo	Exemplo
Perfeito simples	(CG) _n	CGCGCG
Imperfeito simples	(CG) _n TA (CG) _n	CGCGCGTACGCGCG
Composto	(CG) _n (TA) _n	CGCGCGCGTATATATA
Interrompido	(CG) _n TATC (CG) _n	CGCGCGTATCCGCGCG

n= Número de variáveis

Os SSRs são relevantes evolutivamente devido sua instabilidade, pois sofrem altas taxas de mutações que variam entre 10^{-3} e 10^{-6} por geração celular, e amplamente distribuído pelo genoma. Presentes nas regiões de codificação e em regiões não codificantes, com predomínio nas regiões não codificantes do genoma (VIEIRA et al., 2016).

A natureza mutacional dessas regiões ainda não são bem compreendidos, embora muitos estudos tendem explicar mecanismos para essas elevadas taxas de mutação. Um exemplo desses mecanismos são os erros de recombinação que, durante o crossing over, partes desiguais de cada cromossomo pode ser trocada nessas regiões, e, um cromossomo receberá sequência devidamente maior de repetições do que o outro homólogo após a recombinação, acarretando mudanças radicais como o ganho ou perda de um grande número de nucleotídeos para região (OLIVEIRA et al., 2006).

Outra explicação é o *Slippage*, que, durante a replicação, ao sintetizar uma região de repetição em tandem, pode ocorrer uma dissociação temporária da DNA polimerase III, e, ao passar pela região de repetitiva da fita molde e a fita recém-sintetizada, a DNA polímerase se realinha em uma outra sequência acarretando inserção ou deleção de regiões

repetitivas na fita recém-sintetizada, este é o fenômeno mais bem aceito para explicar a instabilidade dos microssatélites (VIGUERA; CANCEILL; EHRlich, 2001).

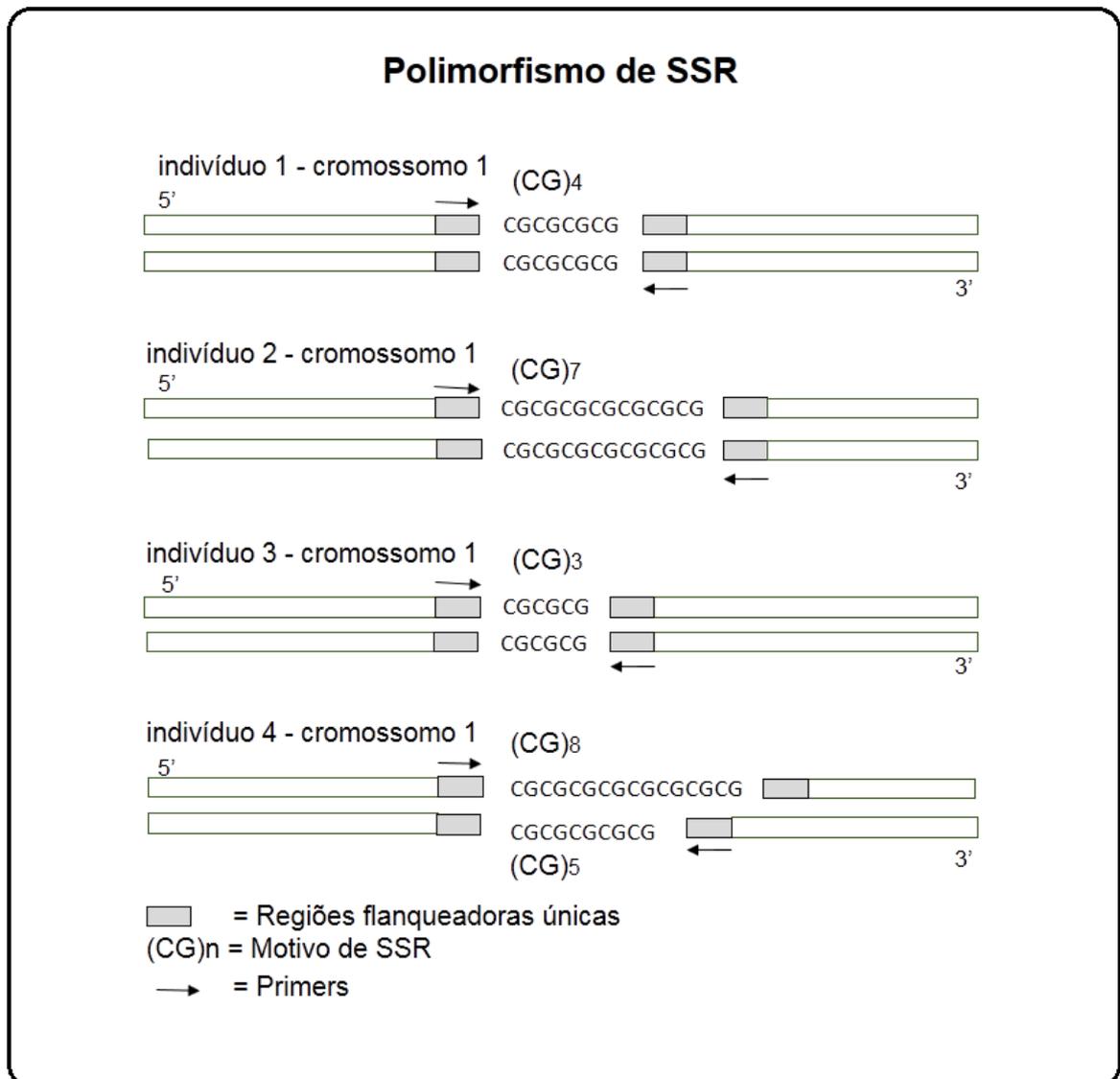


Figura 2. Representação esquemática de alelos que contém sequência de microssatélite e variações quanto ao número de repetições entre os indivíduos. A projeção de primers para amplificação por PCR em regiões flanqueadoras únicas permite a identificação das diferenças nos números de repetições do microssatélite encontrado em cada indivíduo. Indivíduos 1, 2 e 3 são homocigotos e indivíduo 4 é heterocigoto. (Fonte: adaptado de Turchetto-Zolet et al., 2017).

2.7 Genética da conservação

A genética da conservação se originou quando cientistas começaram a relacionar teorias evolutivas com genética, para abordar questões de conservação na década de 1970. Desde então esse campo atraiu muita atenção e tem como objetivo principal a resolução de

problemas genéticos relevantes para a conservação, bem como verificar a adaptação genômica, estrutura genética, diversidade genética e história demográfica (FAN et al. 2018; ZENBOUDJI et al., 2016).

Com o passar dos anos, a biologia da conservação vem se tornando cada vez mais importante. Como resultado das ações antrópicas houve a extinção de várias espécies, e muitas permanecem em ameaça. Nesse contexto, forças ecológicas, políticas e econômicas, tem como preocupação evitar a extinção de espécies ameaçadas. (HEDRICK, 2001)

A diversidade genética são as variações de sequências que ocorrem dentro de espécies. Avaliações da diversidade genética permite a identificação de alelos que viabiliza o organismo a viver em ambientes mais diversificados ou alelos que podem afetar a capacidade de sobrevivência do organismo em seu habitat local. (DURAN et al., 2009).

Populações com o número de indivíduos reduzidos são mais susceptíveis a terem uma maior taxa de acasalamento entre consanguíneos. A endogamia tende a diminuir a variabilidade genética e aumentar os níveis de homozigose, aumentando a chance da manifestação de alelos recessivos, resultando na diminuição da aptidão de espécies naturais FRANKHAM, (2018). O objetivo dos programas de conservação de espécies ameaçadas é manter maiores os níveis de heterozigose nas populações para manter sua evolução e evitar depressão endogâmica, nesse sentido, avaliações da diversidade genética é crucial para manutenção da biodiversidade (CABALLERO; VIGO, 2016; PÉREZ-ESPONA, 2017)

Diante disso, a utilização de técnicas moleculares para análise genética se tornou bastante utilizado em pesquisas de conservação. Portanto, compreender as variações genéticas dentro de uma espécie é importante para verificar seu potencial evolutivo e para o desenvolvimento de estratégias de conservação NEWTON et al., (1999). A genética molecular em estudos populacionais pode ser usada para estimar níveis de migração, verificar impactos da deriva genética na variação genética, estimar fluxo gênico e fazer avaliações do nível de endogamia dentro das populações. Nesse sentido, ferramentas da genética molecular pode auxiliar na conservação de uma gama de espécies (FRANKHAM, 2018; OUBORG et al., 2010).

2.8 Estudos da diversidade genética em peixes neotropicais

No estudo de LANDÍNEZ-GARCÍA; NARVÁEZ; MÁRQUEZ, (2020) foi verificado a estrutura genética de 725 espécimes de *Prochilodus magdalenae*, avaliou 11

locos SSR específicos utilizando sequenciamento de nova geração, seus resultados mostraram que a espécie avaliada exibe alta diversidade genética, coeficiente de edogamia variando de 0,162 a 0,202 e os estoques genéticos se distribuí de forma heterogênea ao longo do rio.

ASHIKAGA et al., (2015) Avaliou os aspectos genéticos de *Brycon orbignyana*, usando marcador molecular SSR e regiões D-loop, com o objetivo de estabelecer áreas prioritárias para conservação com base nos padrões genéticos dessa espécie, seus resultados mostraram que os níveis de variabilidade genética dessa espécie corroboram com os resultados disponíveis na literatura. Entretanto os resultados da análise de variância molecular para SSR ($F_{st} = 0,258$) e D-loop ($F_{st}=0,234$), evidenciou que *B. orbignyana* foi estruturado em diferentes subpopulações ao longo do rio.

LOPERA-BARRERO et al., (2019), Avaliou a diversidade genética de populações em espécimes de peixes Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), curimba (*Prochilodus lineatus*), e piracanjuba (*Brycon orbignyana*) do reservatório de água vermelha, Rio Grande, SP, neste estudo foi observado uma adequada variabilidade genética nas três populações com a presença de déficit de heterozigotos, espécimes de *P. lineatus* apresentaram menor valor de p (0,01) e provavelmente essa espécime foi mais influenciada por recentes reduções populacionais e/ou endogamia.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética existente em populações de *Prochilodus lineatus*, do Rio Claro, na cidade de Caçu (Goiás, Brasil), com o uso de marcadores moleculares microssatélites.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a variabilidade genética dos locus e sua capacidade de discriminação dos indivíduos em espécimes de *P. lineatus* no Rio Claro.
- Avaliar a estrutura genética em diferentes níveis populacionais;
- Contribuir para o estabelecimento de programas de conservação de espécies de peixes neotropicais migratórios;

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentos e procedimentos da coleta de dados

As coletas foram realizadas entre os anos de 2012 e 2014 ao longo da calha principal do Rio Claro na cidade de Caçu, Goiás, Brasil. O Rio Claro está incluído na bacia do rio Paranaíba, região hidrográfica do Paraná, localizado na mesorregião do Sul Goiano, abrangendo dez municípios: Caiapônia, Rio Verde, Jataí, Mineiros, Perolandia, Paranaiguara, Cachoeira Alta, Aparecida Do Rio Doce, Caçu e São Simão. Suas nascentes se localizam no município de Caiapônia serra do Caiapó e sua foz no rio Paranaíba.

As amostras foram coletadas com auxílio de redes de pesca e identificados in loco pelo Biólogo e mestre em Zoologia Rafael Braga do Amaral CRBio 76.258/4-DCTF:2351913, em seguida foram subdivididas em três populações de acordo com as barreiras presentes no rio.

Os espécimes foram coletados com rede de pesca, para cada espécime coletado, foi retirado o fígado e preservado em álcool etílico a 70%. Em seguida as amostras foram encaminhadas ao Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás para processamento e análises.

4.2 Populações e amostras

Foram delimitados cinco pontos de coletas ao longo do rio realizados por uma empresa de biomonitoramento contratada pelas Usinas Hidroeletricas de Caçu e Barra dos coqueiros. As mostras foram subdivididas em populações onde há atividade de resgate e transposição de animais nas regiões de usinas hidroelétricas e barreiras naturais.

O ponto de coleta 1 se localiza antes da barreira natural do salto do marianinho, o ponto de coleta 2 se localiza após o salto do marianinho. O ponto de coleta 3 se localiza antes da barragem da Usina Hidroelétrica de Caçu (UHE – Caçu). O ponto de coleta 4 fica após a barragem da UHE – Caçu. O ponto de coleta 5 está localizado antes da barragem da UHE – Barra dos Coqueiros.

Tabela 3. Descrição das populações utilizadas no estudo e seus respectivos pontos de coleta, coordenadas geográficas na calha principal do rio claro, coletados entre os anos de 2012 e 2014.

Pop	PC	Coordenadas (UTM)	Locais
A	P1	22K 474829 – 7969733	Salto do marianinho área montante da barreira natural. Mediações da (foz do Rio Doce).
	P2	22K 476401 – 7964832	Jusante do Salto do Marianinho e remanso do reservatório da UHE Caçu.
B	P3	22K 484257 – 7951142	Reservatório da UHE Caçu, logo a montante do eixo da barragem (Córrego Caçu)
	P4	22K 484706 – 7950755	Jusante da UHE Caçu/ Remanso do reservatório da UHE Barra dos Coqueiros. (Córrego Pirapitinga).
C	P5	22K 499611 – 7930262	Reservatório da UHE Barra dos Coqueiros, logo a montante do eixo da barragem.

Pop = população; PC = pontos de coleta;

Tabela 4. Populações utilizadas no estudo com seus respectivos pontos de coleta e número de indivíduos.

População	Ponto de coleta	N de indivíduos
A	P1	28
B	P2 e P3	18
C	P4 e P5	16

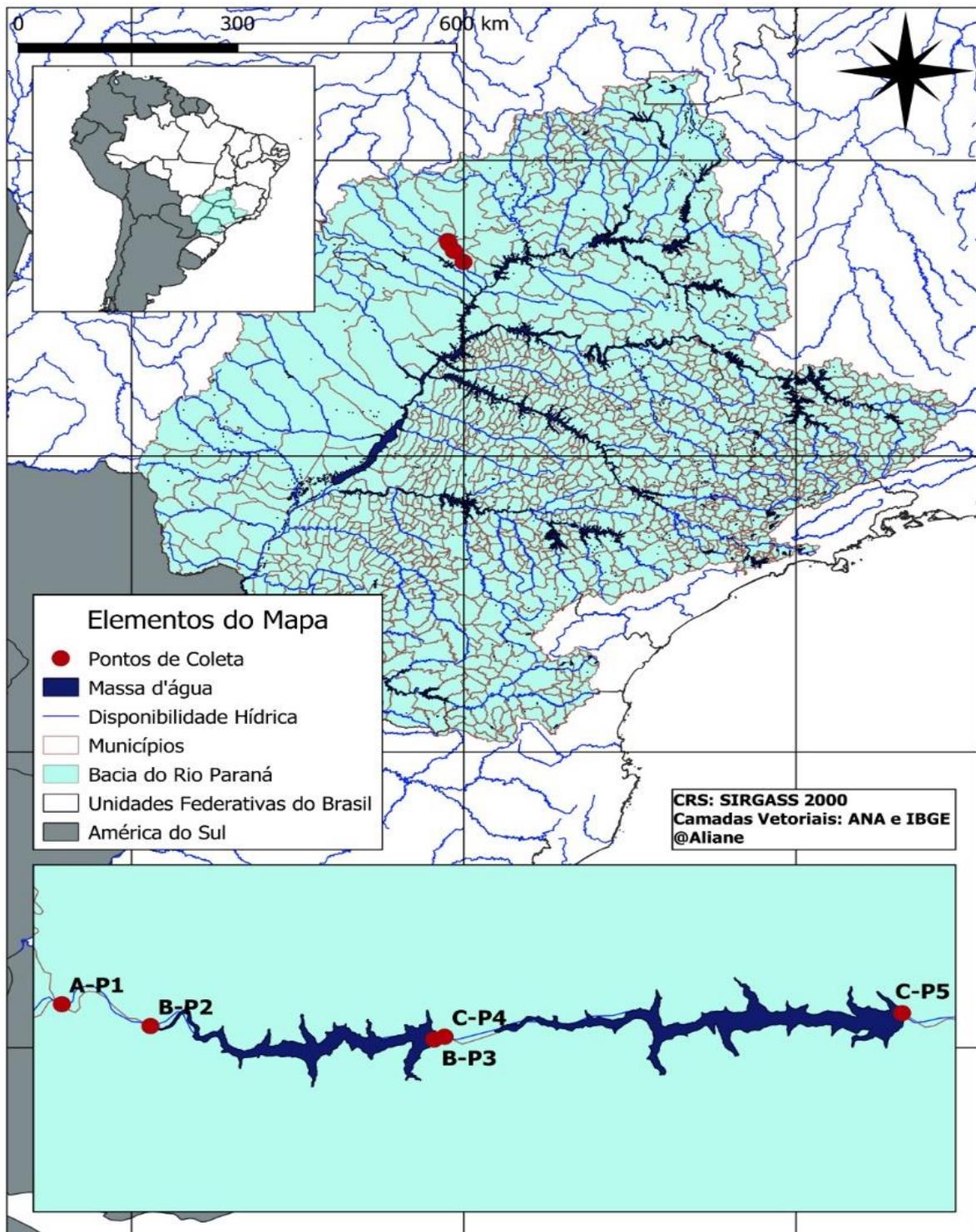


Figura 3. Distribuição geográfica do Rio Claro no município de Caçu, bacia do Paraná Goiás, Brasil, evidenciando os pontos de coleta adotados no estudo (fonte: Sousa 2021).

4.3 Extração e quantificação do DNA

O processamento das amostras e análises foram conduzidas ao Núcleo de Pesquisas Replicon. O procedimento de extração de DNA consistiu, basicamente, nas etapas de lise celular e precipitação das moléculas de DNA utilizando-se reagentes e temperaturas variadas.

O DNA total dos espécimes foram extraídos através do kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corp., EUA). Foi selecionado 20mg de fígado de cada amostra e colocado em um microtubo de 1,5ml adicionado 600 µL de solução de lise celular em cada amostra, o material foi macerado e homogeneizadas no vortex® por 15 segundos, colocado em banho maria a 65°C por 30 minutos. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos e adicionado 200 µL de solução de precipitação de proteínas. O material foi homogeneizado no vortex® por mais 20 segundos com a velocidade de 14.000 rpm, condicionadas no gelo por 5 minutos, colocadas no vortex® novamente por 4 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante do material foi transferido para um tubo novo com 600µL de isopropanol homogeneizado e centrifugado por um minuto a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foi deixado somente o pellet no tubo. Adicionou-se 600 µL de álcool 70% e o material foi centrifugado por um minuto a 14.000 rpm. Aspirou-se o sobrenadante de modo que ficou somente o pellet, deixou os tubos abertos secando o pellet por 15 minutos e acrescidos 100 µL da solução de reidratação em banho maria por uma hora a 65°C, Tabela 5.

Tabela 5. Reagentes utilizados na extração de DNA e suas respectivas quantidades para cada amostra.

Reagente	Quantidade
Solução de lise celular	600 µL
Solução de precipitação de proteínas	200 µL
Isopropanol	600 µL
Álcool etílico	600 µL
Solução de reidratação	100 µL

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas no espectrofotômetro *NanoVue Plus*® (GE Healthcare, EUA) e, posteriormente, quando necessário, foram diluídas para a concentração de 5ng/μL.

4.4 Amplificação dos microssatélites

Foram padronizados 5 marcadores de microssatélites em indivíduos da espécie *P. lineatus*, realizando testes em diferentes temperaturas de anelamento, em busca da temperatura ideal para cada par de primer utilizado no estudo, como podemos observar na tabela 6.

Tabela 6. Identificação e características dos primers utilizados no estudo.

Primer	MR	Sequência do primer	TA
PAR 12	(AAAC) ₇	F: CGAGCTGGTACCGTCACATA R: AGCATGATGCAAAGGATCTG	58 °C
PAR 14	(TGTC) ₅	F: GTATTAGGGGAGAGAATTTG R: TCTCATCAGTTATCACCAAC	48,5 °C
PAR 21	(ATGA) ₆	F: CAAAAGGATAAGTAGCTCAG R: TAGCTCTGTTTATGATGACC	56 °C
PAR 43	(GA) ₆ (CA) ₂ (CAGA) ₄ (GA) ₂₁	F: GGCCTCTGACTCGTTACCTC R: AACCTCATTCCCTCAAGTGC	53 °C
PAR 80	(CT) ₃₇	F: CTAACCTACAAACCTCATTC R: CTGTAAGCTCCACTTATC	52 °C

MR = Motivo de repetição; Temperatura de anelamento padronizada de cada iniciador = TA

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR tiveram um volume final de 13,7 μL contendo 1,5μL de Tampão 10x, 0,5μL de cloreto de magnésio (MgCl₂ à 50mM), 2,2μL de cada *primer* a 0,9mM, 1,3μL de *dNTPs* a 2,5mM, 0,2μL de Taq DNA Polimerase (Phoneutria, Brasil), 2,8μL de água ultra-pura e 3μL de DNA (5ng/μL), (Tabela 7).

Tabela 7. Protocolo PCR para indivíduo da espécie *Prochilodus lineatus* utilizado no estudo.

Reagente	Concentração	Quantidade
H ₂ O	-	2,8 µL
Tampão 10X	10X	1,5 µL
MgCl ₂	50 Mm	0,5 µL
DNTPs	2,5 Mm	1,3 µL
Primer forward	0,9 Mm	2,2 µL
Primer reverse	0,9 Mm	2,2 µL
Taq Polimerase	5 U	0,2 µL
DNA	0,5 ng/µL	3,0 µL
Volume final	-	13,7 µL

Os ciclos de temperaturas foram precedidos por incubação de desnaturação de 5 min a 94°C seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 30 segundos a X °C (anelamento – onde X é a temperatura específica de anelamento de cada primer: PAR 12 - 58 °C; PAR 14 - 48,5 °C; PAR 21 - 56 °C; PAR 43 – 53; °C e PAR 80 - 52 °C). Como observado na tabela 6 e 72°C por 1 minuto e 30 segundos (extensão), 7 minutos a 72°C (extensão final).

4.6 Eletroforese

Os produtos de PCR foram submetidos em corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em campo elétrico uniforme nas condições de 20Ma e 60V por 2h20min, em seguida foram corados com brometo de etídio por 25 min. Os alelos de SSRs foram genotipados no sistema de vídeo documentação de géis usando o Molecular Imager® Gel Doc (Bio-Rad, EUA) interligado a um computador com sistema de imagem Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad, EUA).

4.7 Análises estatísticas

Estimamos o poder de discriminação dos locos através da análise da Probabilidade de Exclusão de Paternidade (Q) Probabilidade de identidade (PI) e, com o uso do programa Identity 4.0. Os parâmetros de estrutura e diversidade genética de heterosigossidade esperada (He), heterosigossidade observada (Ho), riqueza alélica (AR), F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} (WEIR; COCKERHAM, 1984) foram estimados pelo programa FSTAT 2.9.3. A

significância foi confirmada através do teste de T com pacote Rcmdr e auxílio do programa R. Para os parâmetros de número de alelos por loco e alelos privados a análise foi realizada mediante o programa GenAlex 6.51b2 (SMOUSE; BANKS; PEAKALL, 2017).

Para os parâmetros de distância genética entre populações foram estimados os valores de f_{ST} par a par WEIR; COCKERHAM, (1984), gerando uma matriz de distância genética através do pacote *hierfstat* do programa R. A matriz de distâncias genéticas foram utilizadas para a construção do dendograma pelo método de ligação foi construído mediante o método da ligação média entre os grupos (UPGMA), através do uso do pacote *ape* do software R. Também foi realizada a análise de agrupamento por método bayesiano no software STRUCTURE 2.3.4 A estimacão do número de grupos genéticos foram realizadas mediante a estatística MedMedK PUECHMAILLE, (2016), estimadas no programa Structure selector (LI; LIU, 2018).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram avaliados 63 indivíduos de *P. lineatus* das três populações coletados na calha principal do Rio Claro, utilizando cinco loco de SSR. Foi estimada a medida de exclusão de paternidade e probabilidade de identidade, essa estimativa permite verificar a eficácia da distinção individual da bateria de locos. Foi encontrado os valores ($Q = 0,999$ e $PI = 9,507 \times 10^{-11}$), indicando que os cinco locos utilizados no estudo são eficientes para estudos genéticos populacionais, pois foram capazes de discriminar os indivíduos.

Os SSR apresentaram-se altamente polimórficos, sendo que um total de 75 alelos foram encontrados. O número de alelo por loco variou de 10 para o PAR 12 e 20 para o PAR 43. Com uma média geral de 15 alelos por loco (Tabela 8). Os tamanhos dos fragmentos variaram de 132 pb (pares de base) para o PAR 12 a 292 pb para o PAR 43 (Tabela 8). Esses resultados são semelhantes aos de Souza et al., (2018), que amplificou 10 loci em espécimes de *P. lineatus* e detectou 142 alelos com uma média geral de 14,2 alelo/loco, os tamanhos dos fragmentos variaram de 115 a 390pb.

Tabela 8. Número de alelos por loco.

Loci	Número de alelos	Variação de tamanho dos loci (pb)
PAR 12	10	160-204
PAR 14	17	132-244
PAR 21	13	136-184
PAR 43	20	216-292
PAR 80	15	132-220
Total	75	-
Média	15	-

*Pb= pares de base

No estudo de LOPERA-BARRERO et al., (2016) foi avaliado a diversidade genética de seis populações de *P. lineatus* nos rios Mogi-Guaçu, Rio Pardo e Rio Tiete, São Paulo. No estudo dele foi amplificados 10 loci de SSR, obteve 47 alelos e uma média de 4,7 alelo/loci, com tamanhos variando de 118pb a 330pb. Essa diferença da média do número de alelos/loco do nosso estudo quando comparado aos resultados de LOPERA-BARRERO et al., (2016) pode estar relacionada a maior diversidade genética das populações de *P. lineatus* do Rio Claro.

Para os parâmetros de número de alelo/loci por população, o maior número foi observado na população A que apresentou em média de 13,6 alelo/loco. Enquanto a população B obteve uma média de 9,6 alelo/loco e população C obteve a menor média apresentando o número de 8,4 alelo/loci, como pode ser observado na Tabela 9. O número de alelo/loco encontrado na população A corrobora com o fato desta população estar geograficamente distante das barreiras antrópicas presentes no curso do Rio Claro, adicionalmente, a população A recebia vários afluentes que favorece o fluxo gênico entre populações.

Tabela 9. Número de alelos por população.

	A	B	C	Total
PAR 12	9	8	5	22
PAR 14	16	7	10	33
PAR 21	12	9	7	28
PAR 43	16	14	11	41
PAR 80	15	10	9	34
Média	13,6	9,6	8,4	31,6

Os alelos privados (ap), são alelos que ocorrem em uma única população, o número de alelos privados foi estimado para cada locus e população, nosso estudo detectou no total 8 alelos privados distribuídos nas três populações estudadas, sendo pop A = 3ap; pop B = 4ap; e pop C 1ap, na tabela 10 é possível obter informações sobre os alelos privados e suas frequências para cada loco e população nos indivíduos de *P. lineatus*. Considerando frequência superior a 0,05

Tabela 10. Descrição dos 8 alelos privados encontrados em suas respectivas populações, loco, tamanho de alelo e frequência.

População	Loco	Alelo	Frequência
A	PAR 21	176	0,056
A	PAR 43	236	0,096
A	PAR 43	266	0,077
B	PAR 12	196	0,176
B	PAR 43	224	0,219
B	PAR 43	264	0,031
B	PAR 43	276	0,031
C	PAR 14	168	0,031

IWERSEN et al., (2019), avaliou a diversidade populacional em espécimes de *P. lineatus* em quatro pisciculturas e na Bacia do alto do rio Uruguai, ambas na América do Sul. A estrutura genética foi avaliada mediante sete locos de SSRs, no qual foi encontrado

alelos privados para todas as populações avaliadas, corroborando com resultados de nosso estudo.

Foram encontradas variações para as medidas de heterozigidade esperada (H_e) entre 0,8923 (PAR 12) a 0,9416 (PAR 14), com valor médio de 0,9176. Para as medidas de heterozigidade observada (H_o) foram encontrados os valores variando entre 0,4289 para o loco PAR 12 apresentando menor valor e 0,6289 para o loco (PAR 43) com média de 0,5379. Para as medidas de heterozigidade total por loco (H_t) os valores variaram de 0,9059 para o loco PAR 12 e 0,9515 para o loco PAR 14 e média de 0,9325.

As medidas de índice de endogamia por loco (F_{IS}) apresentaram valores que variaram de 0,3114 para o loco PAR 43 a 0,5193 para o loco PAR 12 com média de 0,4138 por loco. A média das medidas de estrutura genética populacional (F_{ST}) foi de 0,0160 por loco, com o menor valor de 0,0105 para o loco PAR 14 e maior valor de 0,0197 para os locos PAR 21 e PAR 43 os valores de F_{ST} por loco indicaram uma pequena diferenciação genética, no entanto foi significativo, indicando subdivisão populacional (Tabela 11). Para o os parâmetros de (F_{IT}) foi encontrado o valor de 0,4242.

Tabela 11. Resultado das estatísticas descritivas dos cinco locos de marcadores microssatélites avaliados nas três populações de *P. lineatus*.

Loco	H_e	H_o	H_t	F_{IS}
PAR 12	0,8923	0,4289	0,9059	0,5193
PAR 14	0,9416	0,5235	0,9515	0,4440
PAR 21	0,9186	0,4853	0,9370	0,4717
PAR 43	0,9133	0,6289	0,9316	0,3114
PAR 80	0,9223	0,6229	0,9364	0,3246
Média	0,9176	0,5379	0,9325	0,4138

Entende se H_e = heterozigidade esperada; H_o = heterozigidade observada; H_t = heterozigidade total; F_{IS} = índice de endogamia;

O valor de H_o foi menor que os valores de H_e para todos os *loci* observados, caracterizando um déficit de heterozigotos, corroborando com o coeficiente de endogamia positivo F_{IS} . LOPERA-BARRERO et al., (2019) avaliou a diversidade genética de espécimes de *Brycon orbignyanus*, *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus* do reservatório de agua vermelha, Rio Grande SP, os valores de H_o foi menor que os valores de H_e para todas espécimes avaliadas também corroborando com o coeficiente de endogamia F_{IS} .

Para as medidas de riqueza alélica por população (R_a), os valores variaram de 11,9025 para população (A), que apresentou o maior valor. E 10,0945 para população (C) que apresentou o menor valor. A população C também obteve os menores valores de

heterozigozidade esperada e heterozigozidade observada sendo ($H_e = 0,9019$ e $H_o = 0,5081$). A população (B) apresentou o maior valor de Heterozigozidade observada ($H_o = 0,5637$), como observado na tabela 12.

Tabela 12. Estatísticas descritivas das 3 populações de *P. lineatus*.

POP	Ra	H_e	H_o	F_{IS}
A	11,9025	0,9364	0,5418	0,4218*
B	10,3585	0,9145	0,5637	0,3814*
C	10,0945	0,9019	0,5081	0,5845*
Média	10,7851	0,9176	0,5378	0,4625*

Entende-se POP = população; Ra = riqueza alélica; H_e = Heterozigosidade esperada; H_o = heterozigozidade observada; F_{IS} = índice de endogamia; * = valores significativos.

O valor de H_o foi menor que os valores de H_e para todos os *loci* observados nas três populações. A baixa heterozigozidade pode ser resultante da subdivisão populacional e estar diretamente relacionada ao endocruzamento recorrente do cruzamento entre aparentados. Os valores de índice de endogamia (F_{IS}) foram significativos para todas as populações estudadas, possivelmente indicando um déficit de heterozigotos resultantes do processo de endogamia. Para os parâmetros do equilíbrio de HardyWeinberg, a população A não aderiu ao equilíbrio em nenhum dos cinco loci analisados, para as populações B e C, somente o loci PAR 80 aderiu ao equilíbrio de HardyWeinberg.

Segundo os autores PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, (2015), Espécimes adultas de *Prochilodus lineatus* tem o hábito de migrar durante a estação chuvosa para desovar e necessitam de habitats distintos com fluxo natural para realizar migrações sazonais e concluir seu ciclo de vida. Entretanto, maioria dos rios da América do Sul são fragmentados por barragens, o que dificulta a passagem de peixes a jusante.

Populações isoladas são mais susceptíveis sofrerem com redução na variabilidade genética, consanguinidade e fixação de alelos deletérios. Esses fatores podem limitar a capacidade de uma determinada espécie se adaptar a mudanças ambientais futuras e aumentar o risco de extinção FONSECA et al., (2017). Nesse sentido os peixes necessitam constantemente do monitoramento da variabilidade genética para possibilitar o desenvolvimento de ações de intervenção que visam na conservação e manutenção da variabilidade genética (SOUZA-SHIBATTA et al., 2018).

A análise de agrupamento do método bayesiano evidência que o melhor valor de K foi de K=2 Figura 4, indicando que as três populações estudadas estão agrupadas em dois grupos genéticos distintos.

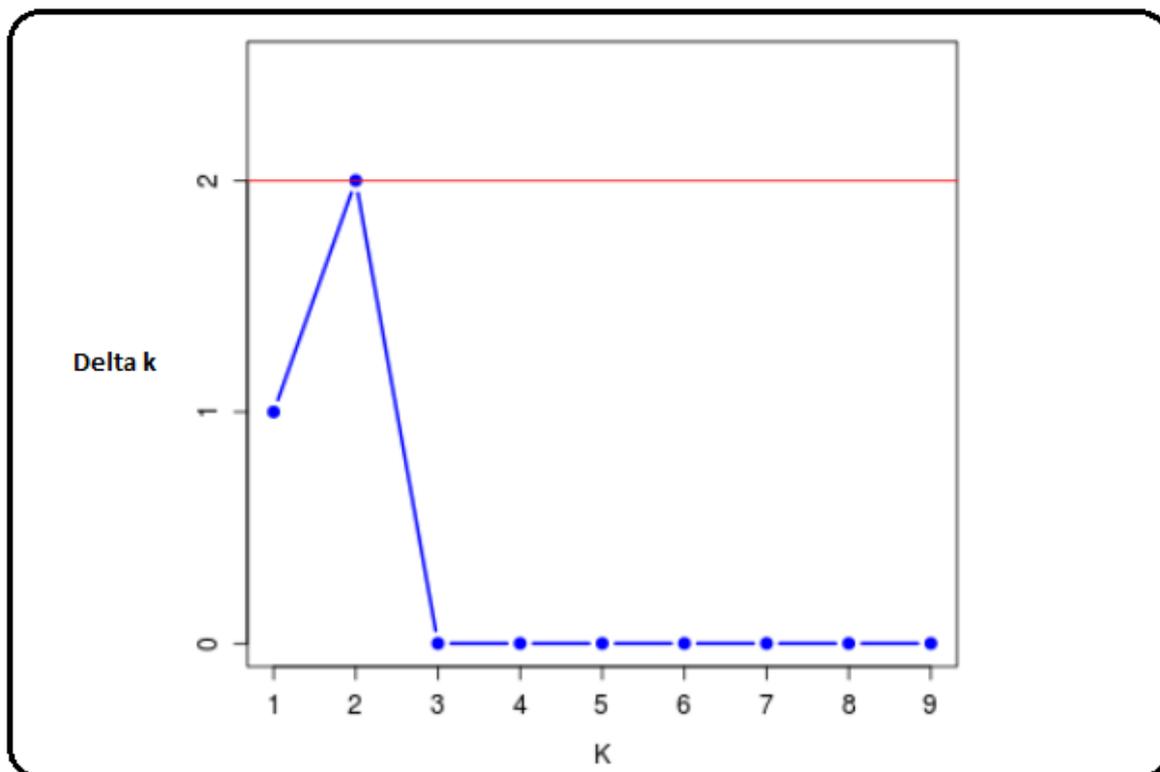


Figura 4. Delta K estimados com os dados dos cinco loci microssatélite, 63 indivíduos, pertencentes as três populações

Análise genética entre as populações demonstrou a formação de dois grupos distintos e uma elevada semelhança genética entre as populações A e B, e a população C foi a que mais se diferenciou das demais, possivelmente pelo fato de a população C estar entre duas barreiras antrópicas. Como pode ser observado na figura 5

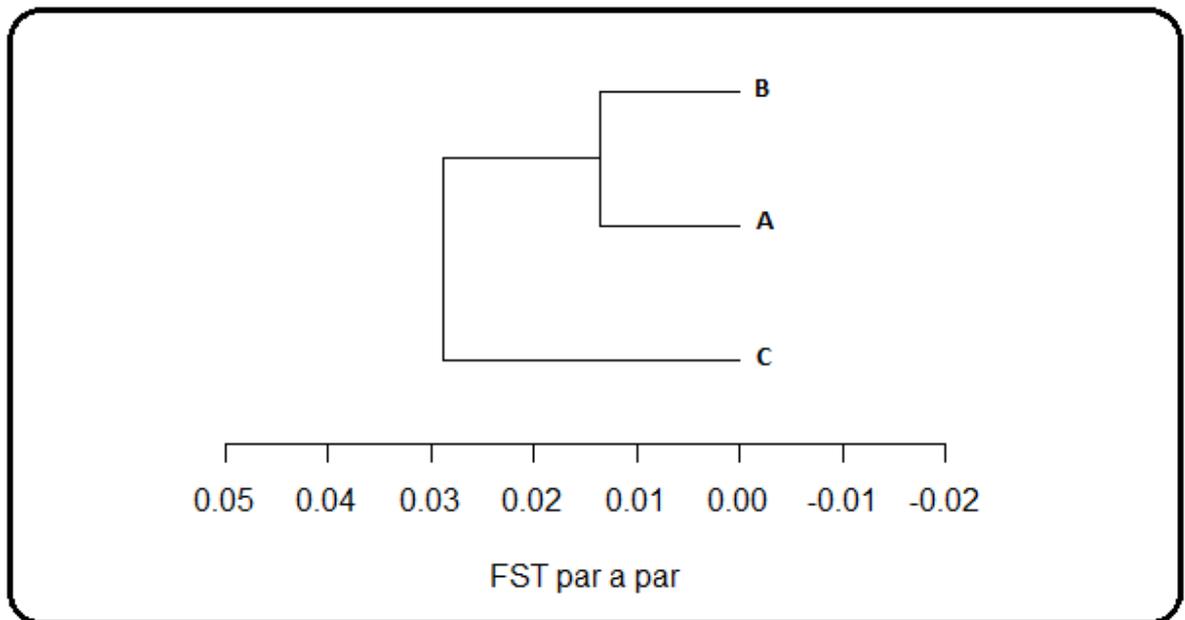


Figura 5. Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Nei (1978) para as populações de *Prochilodus lineatus*. Correlação cofenética do dendrograma: 0,999.

A Distinção da população C com a população A e B, pode estar relacionada com o fato de a população C estar mais isolada e ser composta por espécimes peixes que se localizam entre duas barragens antrópicas. Sendo a Jusante da UHE Caçu e o Reservatório da UHE Barra dos Coqueiros logo a montante do eixo da barragem. Essas barreiras possivelmente podem estar dificultando e/ou impedindo a migração dos peixes entre as subpopulações, uma vez que a mesma existe uma barragem a montante e a jusante, e contribuindo para redução na diversidade genética.

O estudo de ASHIKAGA et al., (2015) avaliou a estrutura genética de *Brycon orbignyanus* no rio La plata com uso do marcador molecular microssatélite, os resultados indicaram que a espécie estudada foi estruturada em diferentes subpopulações no rio. Segundo autor BEGOSSI et al., (2019), a medida em que países em desenvolvimento buscam suprir suas necessidades de energia sem o uso de combustíveis fósseis a construção de usinas hidroelétricas se expande de forma progressiva nas principais bacias hidrográficas do mundo. O desenvolvimento de barragens de usinas hidroelétricas gera vários impactos sob a fauna aquática, dentre eles, o bloqueio de rotas migratórias essenciais para o ciclo de vida de várias espécies de peixes, o que resulta na redução da biodiversidade.

6- CONCLUSÃO

- As populações A B e C apresentaram baixa diversidade genética e alevada endogamia, podendo estar diretamente relacionada com a subdivisão populacional encontradas no Rio Claro, onde os mesmos estão localizados.
- Foram encontrados dois grupos genéticos e a população C foi a mais divergente, possivelmente pelo fato de ela ser a mais isolada, uma vez que as barreiras presentes no rio podem estar dificultando o fluxo gênico.
- Os resultados deste estudo são importantes para indicar aos programas de conservação que a espécie *P. lineatus* pode estar possivelmente sofrendo impactos causados pelas usinas hidroelétricas presentes no Rio Claro.
- As perspectivas futuras deste projeto é aplicar esta pesquisa em outros rios com espécimes *P. lineatus* que habitam em ambientes com presença de barragens de usinas hidrelétricas. No intuito verificar o efeito da barreira em outras populações para contribuir com o estabelecimento de estratégias de conservação.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 617–631, 2008.
- ASHIKAGA, F. Y. et al. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 7, p. 1845–1855, 2015.
- AZEVEDO-SANTOS, V. M. et al. Protected areas: A focus on Brazilian freshwater biodiversity. **Diversity and Distributions**, v. 25, n. 3, p. 442–448, 2019.
- BARRETO, L. S. et al. Urban effluents affect the early development stages of Brazilian fish species with implications for their population dynamics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 188, n. July, p. 109907, 2020.
- BEGOSSI, A. et al. Fish consumption on the amazon: A review of biodiversity, hydropower and food security issues. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 2, p. 345–357, 2019.
- CABALLERO, A.; VIGO, U. DE. Conservation Biology , Quantitative Genetics in. v. 1, p. 354–361, 2016.
- CAMPOS-SILVA, J. V.; PERES, C. A. Community-based management induces rapid recovery of a high-value tropical freshwater fishery. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–13, 2016.
- CAPELETI, A. R.; PETRERE, M. Migration of the curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall “Cachoeira de Emas” of the Mogi-Guaçu river - São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2 B, p. 651–659, 2006.
- CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei:Ostariophysi:Characiformes) : a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 622, p. 1–189, 2004.
- DE SOUZA, F. P.; AZEVEDO, J. P. S. An overview of urban lagoons in Rio de Janeiro: Relevant aspects in the management of Rodrigo de Freitas and Araruama Lagoons and the Jacarepaguá Lagoon system. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 1, p. 197–204, 2020.
- DI CHIACCHIO, I. M. et al. Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. **Theriogenology**, v. 90, p. 284–288, 2017.
- DURAN, C. et al. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and

- Visualisation. **Current Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 16–27, 2009.
- FERREIRA, C. R. et al. Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – 22 e 23 de junho de 2009 Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil 109. **In Vitro**, p. 109–136, 2009.
- FONSECA, F. S. et al. Genetic diversity of an imperiled neotropical catfish and recommendations for its restoration. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. DEC, p. 1–12, 2017.
- FRABLE, B. W. et al. Data on the multilocus molecular phylogenies of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). **Data in Brief**, v. 9, p. 128–142, 2016.
- FRANKHAM, R. **Conservation genetics**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018a. v. 1
- FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Encyclopedia of Ecology**, v. 1, p. 382–390, 2018b.
- HEDRICK, P. W. Conservation genetics: Where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 11, p. 629–636, 2001.
- IWERSEN, L. H. L. et al. GENETIC IMPLICATIONS OF RESTOCKING PROGRAMS ON WILD POPULATIONS OF STREAKED PROCHILOD *Prochilodus lineatus*. **BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA**, v. 3, p. 1–14, 2019.
- KALIA, R. K. et al. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309–334, 2011.
- LANDÍNEZ-GARCÍA, R. M.; NARVÁEZ, J. C.; MÁRQUEZ, E. J. Population genetics of the freshwater fish *Prochilodus magdalenae* (Characiformes: Prochilodontidae), using species-specific microsatellite loci. **PeerJ**, v. 8, p. 1–26, 2020.
- LI, Y. L.; LIU, J. X. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. **Molecular Ecology Resources**, v. 18, n. 1, p. 176–177, 2018.
- LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Monitoramento e conservação genética de populações naturais de. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1621–1628, 2016.
- LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Genetic diversity of migratory fish populations of the rio grande reservoir (São Paulo, Brazil). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 503–510, 2019.
- LOPES, J. DE M. et al. Upstream and downstream migration speed of *prochilodus costatus* (Characiformes: Prochilodontidae) in upper são francisco basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 17, n. 2, p. 1–10, 2019.
- MACHADO, M. R. F.; FORESTI, F. Características morfológicas do curimbatá (*Prochilodus lineatus*) dos estoques migradores e residentes do rio Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 34, n. 4, p. 341–346, 2012.

- MARTELETO, F. M. Os efeitos da introdução de barreiras artificiais em rios sobre a genética populacional em peixes. p. 102, 2015.
- MARTINS, D. DE M. F. et al. Impactos da construção da usina hidrelétrica de Sobradinho no regime de vazões no Baixo São Francisco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 10, p. 1054–1061, 2014.
- MELO, B. F. et al. Molecular phylogenetics of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 102, p. 189–201, 2016.
- MIAH, G. et al. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 22499–22528, 2013.
- MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA - Aplicações no melhoramento de plantas. **Biociência**, n. tabela 1, p. 14–17, 1998.
- MORETTO, E. M. et al. Histórico, tendências e perspectivas no planejamento espacial de usinas hidrelétricas brasileiras: A antiga e atual fronteira amazônica. **Ambiente e Sociedade**, v. 15, n. 3, p. 141–164, 2012.
- NAZIR, A.; KHAN, M. A. Stock discrimination of *Sperata aor* from river Ganga using microsatellite markers: Implications for conservation and management. **Aquatic Living Resources**, v. 30, 2017.
- NEWTON, A. C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, n. 4, p. 140–145, 1999.
- O'HANLON, P. C.; PEAKALL, R.; BRIESE, D. T. A review of new PCR-based genetic markers and their utility to weed ecology. **Weed Research**, v. 40, n. 3, p. 239–254, 2000.
- OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294–307, 2006.
- OUBORG, N. J. et al. Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in Genetics**, v. 26, n. 4, p. 177–187, 2010.
- OVIEDO-OCAÑA, E. R. Las Hidroeléctricas: efectos en los ecosistemas y en la salud ambiental. **Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud**, v. 50, n. 3, p. 191–192, 2018.
- PELICICE, F. M.; POMPEU, P. S.; AGOSTINHO, A. A. Large reservoirs as ecological barriers to downstream movements of Neotropical migratory fish. **Fish and Fisheries**, v. 16, n. 4, p. 697–715, 2015.
- PÉREZ-ESPONA, S. Conservation genetics in the European Union – Biases, gaps and future directions. **Biological Conservation**, v. 209, n. 2017, p. 130–136, 2017.
- PESOA, N. A.; SCHULZ, U. H. Diel and seasonal movements of grumatã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) in the Sinos River,

- Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4 SUPPL., p. 1169–1177, 2010.
- PIMENTEL, J. S. M. et al. High-throughput sequencing strategy for microsatellite genotyping using neotropical fish as a model. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. MAR, p. 1–8, 2018.
- PUECHMAILLE, S. J. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 3, p. 608–627, 2016.
- RIBOLLI, J. et al. Genetic evidence supports polygamous mating system in a wild population of prochilodus lineatus (Characiformes: Prochilodontidae), a neotropical shoal spawner fish. **Neotropical Ichthyology**, v. 18, n. 2, p. 1–15, 2020.
- ROSA, A. J. D. M. Marcadores Moleculares e suas aplicações em estudos populacionais. p. 51, 2010.
- RUOCCO, A. M. C.; PORTINHO, J. L.; NOGUEIRA, M. G. Potential impact of small hydroelectric power plants on river biota: A case study on macroinvertebrates associated to basaltic knickzones. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 4, p. 722–734, 2019.
- SENAN, S. et al. Methods for Development of Microsatellite Markers: An Overview. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 6, n. 1, 2014.
- SMOUSE, P. E.; BANKS, S. C.; PEAKALL, R. Converting quadratic entropy to diversity: Both animals and alleles are diverse, but some are more diverse than others. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–19, 2017.
- SOUZA-CRUZ-BUENAGA, F. V. A. et al. Environmental impacts of a reduced flow stretch on hydropower plants. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 3, p. 470–487, 2019.
- SOUZA-SHIBATTA, L. et al. Genetic diversity of the endangered neotropical cichlid fish (*Gymnogeophagus setequedas*) in Brazil. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. FEB, p. 1–10, 2018.
- SOUZA, F. P. DE et al. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* in artificial and semi-natural reproduction. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, n. 2, p. 321–325, 2018.
- TAVARES MARTINS, R.; CAMPOS DE OLIVEIRA, V.; MOREYRA SALCEDO, A. K. Uso de insetos aquáticos na avaliação de impactos antrópicos em ecossistemas aquáticos. **Insetos Aquáticos na Amazônia Brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**, n. October 2014, p. 724, 2014.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações 2017**.
- VAN TREECK, R. et al. The European Fish Hazard Index – An assessment tool for screening hazard of hydropower plants for fish. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 43, n. October 2020, p. 100903, 2021.
- VIEIRA, M. L. C. et al. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312–328, 2016.

VIGUERA, E.; CANCEILL, D.; EHRLICH, S. D. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. **EMBO Journal**, v. 20, n. 10, p. 2587–2595, 2001.

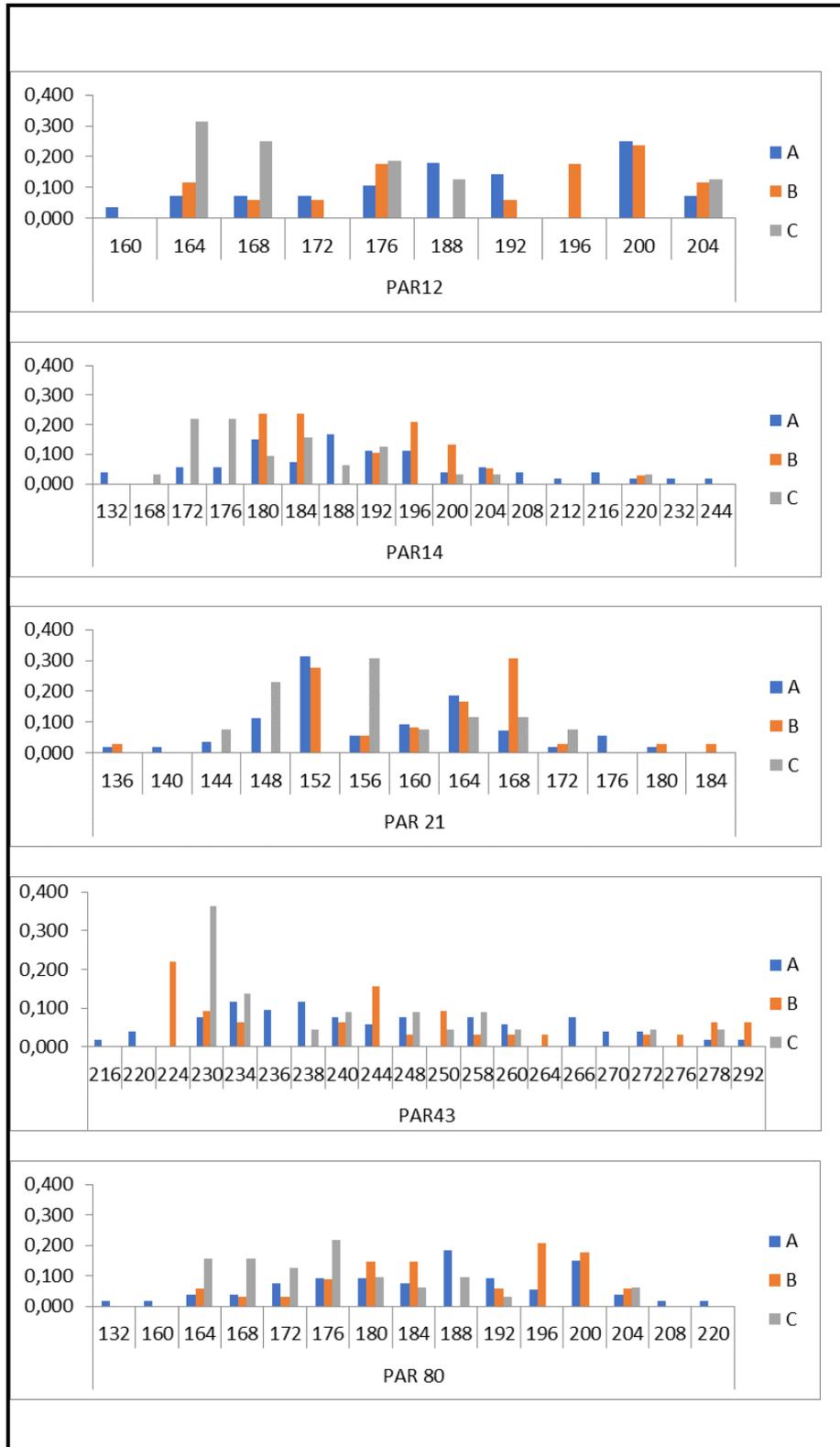
WAGNER, A.; HILSDORF, S.; ORFÃO, L. H. Revista Brasileira de Zootecnia Aspectos gerais do melhoramento genético em peixes no Brasil. v. 2011, p. 317–324, 2011.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358, 1984.

ZENBOUDJI, S. et al. Conservation of the endangered Mediterranean tortoise *Testudo hermanni hermanni*: The contribution of population genetics and historical demography. **Biological Conservation**, v. 195, p. 279–291, 2016.

8- APENDICES

8.1 Gráfico de frequência alélica por loco obtidas em três populações de *P. lineatus* através de cinco locos de marcadores microssatélites.



9- ANEXOS

9.1 licença para monitoramento da fauna


ESTADO DE GOIÁS
SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS HÍDRICOS

Licença para Monitoramento de Fauna

Processo: 122/2013 **Licença: 635/2013**

A SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS HÍDRICOS - SEMARH, no uso de suas atribuições que lhe foram conferidas pela Lei Estadual n.º 12.596/1995, regulamentada pelo Decreto 4.593/1995; Lei n.º 14.241/2002 regulamentada pelo Decreto 5.899 de 09/02/2004 e Instrução Normativa IBAMA nº 146/2007, que concede a presente LICENÇA PARA MONITORAMENTO FAUNÍSTICO, nas condições especificadas abaixo.

Cliente

1. Razão Social: **NEOTROPICA TECNOLOGIA AMBIENTAL**
2. CPF/CNPJ: **06.078.290/0001-72**
3. Endereço: **RUA C-241, nr. 300, JARDIM AMERICA**
4. Município: **Goiânia - GO**

Empreendimento

1. Razão Social: **UHE BARRA DOS COQUEIROS**
2. CPF/CNPJ:
3. Endereço: **, ZONA RURAL,**
4. Município: **Cachoeira Alta - GO**

Bacia Hidrográfica/ Micro Região

1. Bacia Hidrográfica: **Paranaíba**
2. Micro Região: **Sudoeste de Goiás**

Responsável Técnico:

1. Nome: **()**
2. RG Profissional:

Atividade Licenciada: Licença para Manejo de Fauna

Parâmetros

1. Táxon | Herpetofauna: **3 espécimes/espécie**
2. Táxon | Ictiofauna: **3 espécimes/espécie**
3. Táxon | Mastofauna|Grande Porte: **0 espécimes/espécie**
4. Táxon | Mastofauna|Pequeno Porte: **3 espécimes/espécie**
5. Táxon | Mastofauna|Quirópteros: **3 espécimes/espécie**
6. Táxon | Ornitofauna: **0 espécimes/espécie**

Exigências Técnicas - Observações

1. A presente Licença para monitoramento faunístico, está sendo concedida com base nas informações constantes do processo e não dispensa e nem substitui, outros alvarás ou certidões exigidas pela Legislação Federal, Estadual ou Municipal;
2. A presente Licença para monitoramento faunístico, refere-se tão somente aos locais das atividades previstas neste licenciamento;
3. É necessário que todos os procedimentos processuais e de execução do projeto respeitem a Instrução Normativa no. 146 de 10 de janeiro de 2007, do IBAMA;
4. Qualquer ato que venha infringir a legislação ambiental vigente e que não esteja de acordo com as exigências técnicas será de inteira responsabilidade da equipe técnica responsável por este projeto;
5. A SEMARH deve ser comunicada com antecedência sobre o período do resgate, que poderá ser acompanhado pelos fiscais da SEMARH;

6. Devem ser obedecidos os objetivos propostos no projeto apresentado, sendo que qualquer alteração deverá ser previamente comunicada a SEMARH;
7. Somente deverão ser sacrificados e encaminhados para testemunho científico os espécimes cuja identificação não pôde ser feita em campo, numa quantidade máxima, por campanha, igual ao valor especificado nos parâmetros da presente licença;
8. Os animais encontrados mortos ou que venham a perecerem durante o monitoramento, seja na área de pesquisa ou no centro de triagem serão devidamente preparados e encaminhados à instituição científica conveniada para estudos, de acordo com o permitido nesta licença. A partir do recebimento do animal pela instituição a responsabilidade total sobre este será do referido órgão;
9. O transporte da fauna será acompanhada por membro da equipe técnica, juntamente com cópia desta licença, acompanhada da ficha com as características de cada espécime (tamanho, peso, estado geral, etc), quantidade, nome científico e vulgar, assinada pelo responsável técnico;
10. Para o estudo de todos os grupos deverá ser abrangido as fitofisionomias presentes na área de estudo, contemplando a sazonalidade da região;
11. A equipe responsável pelos trabalhos deverá apresentar relatório das atividades desenvolvidas, imediatamente após o término das mesmas. Os relatórios deverão detalhar sobre os espécimes coletados (dados específicos) e Declaração da Instituição Responsável pelo recebimento de material biológico contendo todos os dados referentes aos indivíduos coletados (Biometria; Classificação; Quantidade; Nome Científico etc), Detalhes do tombamento (incluindo o número dos tombos) à medida que for encaminhado o material biológico. Os relatórios poderão ser entregues por via digital (CD-ROM);
12. A SEMARH deverá ser comunicada, imediatamente, em caso de acidentes que envolvam o Meio Ambiente;
13. A SEMARH reserva-se o direito de revogar a presente Licença no caso de descumprimento de suas condicionantes ou de qualquer dispositivo que fira a Legislação Ambiental vigente, assim como, a omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiem a sua expedição, ou superveniência de graves riscos ambientais e de saúde;
14. Conforme disposto na Resolução CONAMA 006/86, o Licenciado deverá providenciar a publicação do recebimento da presente licença no prazo de 30 (trinta) dias a partir desta data, podendo a mesma ser suspensa, caso não haja cumprimento desta;
15. É expressamente proibido qualquer ato lesivo contra a Fauna de acordo com a Lei 9.605 de 12 de fevereiro de 1998, em sua seção I, dos Crimes contra a Fauna no caput do Art. 29, III;
16. A renovação da presente Licença deverá ser requerida com antecedência mínima de 120 (cento e vinte) dias da expiração de seu prazo de validade;
17. Esta licença não autoriza: - Captura/coleta/transporte de espécies ameaçadas de extinção, salvo quando constante de projeto específico aprovado - Captura/coleta/transporte de material biológico em áreas de domínio privado, sem o consentimento expresso ou tácito do proprietário nos termos dos artigos 594, 595, 596, 597 e 598 do código civil; - Captura/coleta/transporte de fauna e flora em unidades de conservação federais, estaduais, distritais ou municipais, salvo quando acompanhadas do consentimento do órgão administrador competente; - Exportação de animal vivo ou material zoológico; - Esta licença não exime o coordenador de cumprir o disposto na MP 2186-16/01 que versa sobre acesso ao patrimônio genético. No caso de acesso a amostra de componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante autorização expressa do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), nos termos da Medida Provisória 2.186-16/01 e Decreto 3.945/01;
18. Deverá ser encaminhada à SEMARH relatórios trimestrais com os resultados das campanhas e, ao final de um ano, relatório final com o resultado acumulado das quatro campanhas e tratamento estatístico para análise da eficiência do programa, como forma de obtenção da renovação da licença. (monitoramento)
19. A renovação da presente Licença deverá ser requerida com antecedência mínima de 120 (cento e vinte) dias da expiração de seu prazo de validade.
20. A SEMARH reserva-se no direito de fazer novas exigências, caso necessário.

Exigências Técnicas - Complementares

1. Apresentar no prazo de 30 (trinta) dias a partir desta data, a Anotação de Responsabilidade Técnica de Serviço referente a UEH CAÇU do profissional Rafael Braga do Amaral, podendo a licença ser suspensa, caso não haja cumprimento;
2. No Monitoramento deverá ser contemplado o estudo de prováveis áreas destinadas à soltura da fauna durante o resgate;
3. Os baldes utilizados para captura de répteis e pequenos mamíferos devem ser lacrados ao final de cada campanha, para impedir capturas acidentais;

Nota

1. LOCALIZAÇÃO: • Área de influência das UHEs Caçu e Barra dos Coqueiros, no rio Claro, entre os municípios de Caçu e Cachoeira Alta, Goiás.
2. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES: • Captura, coleta e transporte de fauna e ictiofauna para monitoramento pós-enchimento, e avaliação dos impactos advindos da implantação do empreendimento.
3. RESPONSABILIDADE TÉCNICA: • Gerdau Aços Longos S.A. – CNPJ nº 07.358.761/0056-32 (empreendedor)
• Neotropica Tecnologia Ambiental – CNPJ nº 06.078.290/0001-72 (empresa responsável pelos trabalhos).
4. EQUIPE TÉCNICA: • Jaine Silveira dos Reis (CRBio nº 057827/04-D) – Quiróptero-fauna/Coordenação Geral
• Flávio Cardoso Poli (CRBio nº 049953/04-D) – Herpetofauna • Caio Stuart Amorim Pereira (CRBio nº 070701/04-D) - Ornitofauna • Kleber do Espírito Santo Filho (CRBio nº 049712/04-D) – Entomofauna • Humberto Caiado Azevedo (CRBio nº 080201/04-D) - Mastofauna • Rafael Braga do Amaral (CRBio nº 044605/04-D) - Ictiofauna
5. DETALHES DA CAPTURA: • Mastofauna - Os pequenos mamíferos serão inventariados e monitorados através de métodos tradicionais de captura em armadilhas de arame tipo "gancho" e dobráveis de alumínio tipo "sherman", sendo um total de 160 armadilhas/área (80 ganchos e 80 shermans). Para mamíferos de médio e grande porte serão realizados censos para procura de vestígios e instaladas câmeras-traps. Os morcegos deverão ser capturados com redes de neblina, ao nível do solo, utilizando-se 10 redes de náilon de malha fina, de tamanho 3,0 m x 12,0 m e malha 38 mm. • Ornitofauna - Para a determinação da avifauna será utilizada uma combinação de metodologias rápidas de detecção de registros visuais/auditivos e capturas com redes de neblina. Serão instaladas linhas de 20 redes (10 metros de comprimento e 2,5 m de altura, malha 32 mm) • Herpetofauna - haverá uma combinação de métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos são o uso de armadilhas de queda (pitfalls), procura visual e auditiva, visitas a sítios propícios para a reprodução de anfíbios, procura de carro e encontros ocasionais. Em cada área de amostragem serão instalados conjuntos de armadilhas de queda. Cada conjunto é composto por cinco a dez baldes de 60 ou 100 l, enterrados a intervalos de 15 m. • Ictiofauna - Os instrumentos de coleta serão redes do tipo espera, pindas, peneiras e tarrafas.
6. DESTINO DO MATERIAL BIOLÓGICO: • Centro de Estudos e pesquisas Biológicas (CEPB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Setor Universitário, Goiânia, Goiás • Universidade Estadual de Goiás, Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis, Goiás.

Validade da Licença: 26/03/2014

Goiânia, 26/03/2013.

Carla S. G. da Silva
Carla Stephanie Garcia da Silva
Biólogo

GERÊNCIA DE FAUNA E FLORA

P/ Elida Cruz Nascimento Tavares
Elida Cruz Nascimento Tavares
Analista Ambiental

GERÊNCIA DE FAUNA E FLORA

Elida Cruz Nascimento Tavares
Elida da Cruz Nascimento Tavares
Gerente

GERÊNCIA DE FAUNA E FLORA

Elaboração:

Eliane Dias Amorim
Eliane Dias Amorim

SUPERINTENDÊNCIA DE LICENÇA E MONITORAMENTO