



Universidade Federal
de São João del-Rei



Universidade Federal de São João del-Rei
Laboratórios de Recursos Genéticos
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

**Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* em regiões
sob influência de barragens de hidrelétricas no sistema do
alto rio Grande – MG**

Gésica Aparecida Santana Nascimento

São João del-Rei
Julho de 2024

Universidade Federal de São João del-Rei
Laboratórios de Recursos Genéticos
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

**Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* em regiões
sob influência de barragens de hidrelétricas no sistema do
alto rio Grande – MG**

Gésica Aparecida Santana Nascimento

São João del-Rei
Julho de 2024

Gésica Aparecida Santana Nascimento

**Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* em regiões
sob influência de barragens de hidrelétricas no sistema do
alto rio Grande – MG**

Orientador: Gabriel de Menezes Yazbeck

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ecologia da Universidade Federal de
São João del-Rei, como requisito parcial
à obtenção do título de mestre.

São João del-Rei

Julho de 2024

Gésica Aparecida Santana Nascimento

Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* em regiões sob influência de barragens de hidrelétricas no sistema do alto rio Grande – MG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gabriel de Menezes Yazbeck
Universidade Federal de São João del-Rei
Assinatura:

Prof. Dr. Rafael Félix de Magalhães
Universidade Federal de São João del-Rei, MG.
Assinatura:

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, SP.
Assinatura:

Financiamentos:



Universidade Federal
de São João del-Rei



Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N244d Nascimento, Gésica Aparecida Santana .
Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* em
regiões sob influência de barragens de hidrelétricas
no sistema do alto rio Grande - MG. : Capítulo 1:
Desenvolvimento e caracterização de novos marcadores
microsatélites para a espécie *Prochilodus lineatus*.
Capítulo 2: Diversidade genética de *Prochilodus*
lineatus em regiões sob influência de barragens de
hidrelétricas no sistema do alto rio Grande - MG. /
Gésica Aparecida Santana Nascimento ; orientador
Gabriel de Menezes Yazbeck. -- São João del-Rei,
2024.
125 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Ecologia) -- Universidade Federal de São João del
Rei, 2024.

1. Ecologia. 2. Genética de populações. 3.
Biologia molecular. 4. Bioinformática. 5. Biologia.
I. Yazbeck, Gabriel de Menezes, orient. II. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 6 / 2024 - PGE (13.08)

Nº do Protocolo: 23122.022122/2024-51

São João del-Rei-MG, 02 de agosto de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL - REI / UFSJ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA / PGE



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - M.Sc.

Aos trinta dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte quatro, às 14h, na Universidade Federal de São João del - Rei, instalou-se a banca examinadora de dissertação de mestrado da aluna Gésica Aparecida Santana Nascimento. A banca examinadora foi composta pelo professor **Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, UFSCar**, examinador externo, pela professora **Dra. Gislene Carvalho de Castro, UFSJ**, examinadora interna, e pelo professor **Dr. Gabriel de Menezes Yazbeck, UFSJ**, orientador. Deu-se início a abertura dos trabalhos, por parte do professor Gabriel de Menezes Yazbeck, que, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou a candidata que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada "**Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* em regiões sob influência de barragens hidrelétricas no sistema do Alto Rio Grande - MG**", marcando um tempo de quarenta minutos para a apresentação. Concluída a exposição, o Prof. Gabriel de Menezes Yazbeck, presidente, passou a palavra ao examinador externo, professor Pedro Manoel Galetti Junior, para arguir a candidata, e, em seguida, à examinadora interna, professora Gislene Carvalho de Castro para que fizesse o mesmo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, a candidata foi **APROVADA**, conforme as normas vigentes na Universidade Federal de São João del - Rei. A versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa no prazo de 30(trinta) dias, a contar da data de defesa, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante na folha de correção anexa, conforme o artigo 97 da Resolução CONEP Nº 001, de 15 de março de 2023. A candidata não terá o título se não cumprir as exigências acima descritas

(Assinado digitalmente em 02/08/2024 11:19)
GABRIEL DE MENEZES YAZBECK
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DEZOO (12.28)
Matrícula: 1571747

(Assinado digitalmente em 07/08/2024 19:39)
GISLENE CARVALHO DE CASTRO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCNAT (12.12)
Matrícula: 1672415

(Assinado digitalmente em 02/08/2024 09:37)
PEDRO MANOEL GALETTI JUNIOR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 746.719.608-34

(Assinado digitalmente em 06/08/2024 09:40)
GÉSICA APARECIDA SANTANA NASCIMENTO
DISCENTE
Matrícula: 2022101667

Visualize o documento original em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **6**, ano: **2024**, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão: **02/08/2024** e o código de verificação: **c3603639a5**

AGRADECIMENTOS

Ao final dessa etapa tão difícil e ao mesmo tempo gratificante, uma das fases mais prazerosas a se fazer, certamente é elaborar os agradecimentos. Vamos lá!

Primeiramente, agradeço a Deus, meu suporte e guia, mesmo quando o caminho parecia incerto e por diversas vezes difícil de prosseguir.

Ao meu Orientador, Professor Gabriel de Menezes Yazbeck por todo o suporte, paciência, confiança, incentivo, conselhos, conhecimento e sabedoria compartilhados.

Agradeço a todos os membros do laboratório (LARGE – UFSJ) que, de alguma forma, contribuíram para que esse projeto pudesse se concretizar. Em especial a Leiliane Campos de Carvalho, que, com paciência e insistência, me ensinou muito do que sei hoje. Também agradeço a Raissa Graciano, Roseane P. Santos por todo conhecimento compartilhado. Monica Soares e João por todo suporte.

Ao órgão financiador da bolsa (UFSJ) que me permitiu completar mais este ciclo da minha vida acadêmica.

Um agradecimento especial á Sônia e Donizzete de Itutinga, que gentilmente nos ajudaram a coletar as amostras de curimba.

Também ao senhor Jailson da piscicultura de Itutinga, sempre disposto a ajudar, e dividir um pouco do seu conhecimento e gentileza.

Agradeço aos meus colegas e amigos do Programa de pós-graduação em Ecologia, que compartilharam as fases desse processo, tanto as boas como as difíceis, em especial a Carolina Quirino. Obrigada por todo apoio, parceria e muitas conversas. Também, a Layane Viol, pelas conversas e companhia nas incontáveis viagens de ônibus e noites passadas em hotéis.

Aos meus professores por todo conhecimento e experiências compartilhadas.

A minha família, em especial aos meus pais Adailton Santana e Rosa Santana, pela paciência nas diversas vezes que estive ausente e por todo incentivo.

Agradeço, também, a um grande amigo, Professor Delton Mendes. Ele é o responsável por eu estar aqui. Muito Obrigada!

Ao meu marido Roney, que embarcou nessa trajetória comigo e abraçou a causa verdadeiramente, me ajudando em tudo que eu precisei.

Aos meus amados filhos Luís Guilherme e Thiago, agradeço pela compreensão por toda minha ausência, agradeço pelo amor de vocês, pelo incentivo, companheirismo. Vocês são o amor da minha vida e também a motivação para o meu crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. CAPÍTULO 1	
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE <i>PROCHILODUS LINEATUS</i>	20
1.1 INTRODUÇÃO	21
1.1.2 MARCADORES MOLECULARES: MARCADORES DE MICROSSATÉLITES DE DNA	23
1.2 OBJETIVO	26
1.2.1 OBJETIVO GERAL	26
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
1.3.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES	27
1.3.2. EXTRAÇÃO DNA GENÔMICO	27
1.3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ELETROFORESE	28
1.4. RESULTADO E DISCUSSÃO	30
1.5 CONCLUSÃO	35
2. CAPÍTULO 2	
DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>PROCHILODUS LINEATUS</i> EM REGIÕES SOB INFLUÊNCIA DE BARRAGENS DE HIDRELÉTRICAS NO SISTEMA DO ALTO RIO GRANDE – MG	36
2.1. INTRODUÇÃO	37
2.1.1. SUB-BACIA DO RIO GRANDE.....	37
2.1.2 USINAS HIDRELÉTRICAS E A ICTIOFAUNA NEOTROPICAL.....	40
2.1.3 MECANISMOS DE TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES OU SISTEMAS DE TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES E PEIXAMENTO.....	41
2.1.4 <i>PROCHILODUS LINEATUS</i> (VALENCIENNES, 1836).....	43
2.1.5 GENÉTICA POPULACIONAL DE PEIXES DE PIRACEMA.....	45
3.OBJETIVO	49
3.1. OBJETIVO GERAL.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1. ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM.....	50
4.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ELETROFORESE.....	51
4.4. ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE <i>PROCHILODUS LINEATUS</i>	51
5.RESULTADOS	55

5.1. INFERÊNCIA POR ESTIMAÇÃO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DE ADMISTURA	61
5.2. INFERÊNCIA BAYESIANA DE ADMISTURA	72
5.3. ABORDAGENS EXPLORATÓRIAS E ANÁLISE DISCRIMINANTE	75
6. DISCUSSÃO	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE A - FIGURAS SUPLEMENTARES	105
APÊNDICE B - TABELAS SUPLEMENTARES	111

RESUMO

Este trabalho caracteriza e apresenta o maior conjunto de marcadores moleculares de DNA microssatélites já validados para a curimba, *Prochilodus lineatus*, a espécie de piracema mais significativa para a pesca na grande bacia do rio da Prata. O estudo tem como objetivo, ainda, empregá-los em uma análise inédita da estrutura genética desta espécie, em peixes separados pelas três últimas barragens de usinas hidrelétricas (UHE) do alto rio Grande, MG, um rio densamente interrompido por barramentos. Peixes migratórios Neotropicais enfrentam diversas ameaças, incluindo a degradação do habitat, poluição da água e a fragmentação do rio pela construção UHE, que comprometem suas migrações. Microssatélites permitem a avaliação de polimorfismos de comprimento de DNA, consagrados como marcadores moleculares úteis na elucidação da estrutura genético-populacional, a forma como a variação genética está distribuída dentro e entre populações. Um total de 15 novos marcadores de DNA microssatélites foram validados para *P. lineatus* e utilizados para revelar um padrão de tipo-fractal da estrutura genética de 140 indivíduos coletados nas regiões das UHE do Funil, Camargos e Itutinga, MG, sendo esta última amostrada em dois momentos, em um intervalo de 10 anos. Para isso foram empregados métodos tradicionais da descrição da variabilidade genética intra e interpopulacionais, além de análises exploratórias, como uma análise discriminante de componentes principais. Ademais, foram realizadas abordagens de inferência por estimação de máxima verossimilhança e por estatística Bayesiana, baseadas no modelo de admistura de populações. O padrão de variação encontrado foi dissecado por meio de uma análise hierárquica dos dados, que evidenciou a presença de estoques mistos de *P. lineatus* no alto rio Grande, com grande variação genética entre indivíduos e fraca associação direta com localidades e momentos específicos amostrados. No entanto, foi detectado efeito de variação e distanciamento genético entre e dentro de localidades é possível efeito de isolamento para Camargos e o restante do alto rio Grande, um trecho de importância e possível área prioritária para a conservação da ictiofauna. Dois grandes grupos geneticamente distintos de peixes foram identificados, o que sugere a existência de sítios de reprodução separados antes da interposição de barragens da UHE, como o rio das Mortes e o alto rio Grande, por exemplo. Estes se desdobram reiteradamente de forma similar, até a definição de oito possíveis grupos. Isso pode refletir a complexidade hidrográfica de tributários de diferentes ordens e seu uso para a reprodução desta espécie e/ou efeitos recentes de isolamento devido a barragens e pela influência genética não-planejada de introdução de espécimes produzidos em pisciculturas (peixamentos), executados na tentativa de mitigar os impactos de barragens. Este trabalho fornece novos subsídios (ferramentas moleculares) para o estudo desta espécie na América do Sul, além de novos pontos de referência sobre a natureza genética de cardumes de *P. lineatus* na bacia do alto rio Grande, um promissor modelo para o contínuo estudo e elucidação destas e outras questões pertinentes à conservação de peixes migratórios, no contexto da influência de UHE e de possíveis medidas para a mitigação de seus impactos ambientais.

Palavras-chave: Estrutura Genética de Populações, Gestão Ambiental, Microssatélites, Produção hidrelétrica, Recursos pesqueiros

ABSTRACT

This work characterizes and presents the largest set of microsatellite DNA molecular markers ever validated for the *curimba*, *Prochilodus lineatus*, the most significant *piracema* species for fisheries in the large River Plate Basin. The study also aims to apply it in an unprecedented analysis of the genetic structure of this species, in fish separated by the last three dams from hydroelectric plants (UHE) from the the Upper Grande River, MG, a river densely interrupted by dams. Neotropical migratory fishes face several threats, including habitat degradation, water pollution and river fragmentation due to UHE construction, which compromises migratory runs. Microsatellites allow the evaluation of DNA length polymorphisms, established as useful molecular markers in elucidating population genetic structure, the way in which genetic variation is distributed within and between populations. A total of 15 new microsatellite DNA markers were validated for *P. lineatus* and used to reveal a fractal-like pattern of the genetic structure of 140 individuals collected around UHE Funil, Camargos and Itutinga, MG, the latter being sampled in two moments, within a 10-year span. For this purpose, traditional methods for describing intra and interpopulation genetic variability were used, in addition to exploratory analyses, such as a discriminant analysis of principal components. Furthermore, inference approaches were carried out using maximum likelihood estimation and Bayesian statistics, based on the population admixture model. The pattern of variation found was dissected through a hierarchical analysis of the data, which highlighted the presence of mixed stocks of *P. lineatus* in the upper Grande River, with high genetic variation between individuals and weak direct association with specific sampled locations and moments. However, a genetic variation and distance effect was detected between and within locations, along a possible isolation effect for Camargos and the rest of the upper Grande River, an important stretch and possible priority area for the ichthyofauna conservation. Two large genetically distinct groups of fish were identified, suggesting the existence of separate breeding sites before the interposition of UHE, such as the Mortes River and the Upper Grande River, for example. These unfold repeatedly in a similar way, until the definition of eight possible groups. This may reflect the hydrographic complexity of tributaries of different orders and their use for the reproduction of this species and/or recent isolation effects due to dams and the unplanned genetic influence of the introduction of specimens produced in hatcheries, carried out in an attempt to mitigate the impacts of dams. This work provides new subsidies (molecular tools) for the study of this species in South America, in addition to new points of reference on the genetic nature of schools of *P. lineatus* from the Upper Grande River Basin, a promising model for the continued study and elucidation of these and other issues pertinent to the conservation of migratory fish, in the context of the influence of UHE and possible measures to mitigate their environmental impacts.

Key-words: Genetic Structure of Populations, Environmental Management, Microsatellites, Hydroelectric production, Fisheries resources

LISTA DE ABREVIações

AFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento
AMOVA	Análise de Variância Molecular
CEMIG	Companhia Energética de Minas Gerais
CEUA	Comitê de Ética no uso de Animais
CG	Citosina/Guanina
CGH	Centrais Geradoras Hidrelétricas
DAPC	Análise Discriminante de Componentes Principais
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PCR	Reação em cadeia da polimerase
LARGE	Laboratório de Recursos Genéticos
MCMC	Cadeia de Markov Monte Carlo
MLE	Estimativa de máxima-verossimilhança
MTPs	Mecanismos de transposição de peixe
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
pb	Pares de bases
PCH	Pequena Central Hidrelétricas
PCA	Análise de componentes principais
PCoA	Análise de coordenadas principais
PPGBiotec	Programa de Pós Graduação em Biotecnologia
PNE	Plano Nacional de Energia
STPs	Sistemas de transposição de peixes
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UHE	Usina Hidrelétricas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplar de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) no seu ambiente natural, em Bonito, MS. Repare o aparelho bucal característico, em forma de funil invertido.....	19
Figura 2	Mapa mostrando as principais Usinas Hidrelétricas na região da Bacia do Paraná e seus principais afluentes.....	37
Figura 3	Estimativas de D_{LK2} e F_{STIS} de melhor valor de número de <i>clusters</i> (K), segundo a análises de MLE em <i>Prochilodus lineatus</i> do alto rio Grande, sobre a amostra total de 140 peixes.....	60
Figura 4	Inferência de MLE de agrupamentos de indivíduos de <i>Prochilodus lineatus</i> em dois <i>clusters</i>	61
Figura 5	Estimativas de D_{LK2} e F_{STIS} de K para análise dos <i>clusters</i> de 2ª ordem.....	62
Figura 6	Resultado da análise hierárquica de 2ª ordem mostrado em gráfico de barras.	63
Figura 7	Estimativas de D_{LK2} e F_{STIS} de K para análise dos <i>clusters</i> de 3ª ordem. A-D resultados para cada um dos quatro <i>clusters</i> distintos definidos na análise de 2ª ordem	64
Figura 8	Resultado da análise hierárquica de 3ª ordem. A-D representam a decomposição dos quatro <i>clusters</i> de 2ª ordem, apresentando oito novos agrupamentos dos 140 peixes.....	65
Figura 9	Valores de ΔK estimados sobre 20 réplicas, com os dados de 15 <i>loci</i> , 140 indivíduos nas quatro amostras populacionais de <i>Prochilodus lineatus</i>	71
Figura 10	Resultado da corrida do método de Delta K =8 de agrupamentos dos indivíduos de <i>Prochilodus lineatus</i>	72
Figura 11	Valor de $\ln P(K)$ método de Parcimônia estimado com os dados dos 15 <i>loci</i> , 140 indivíduos nas 4 populações amostradas, para K=8.....	72
Figura 12	Resultado da corrida do método de Parcimônia K =8 de agrupamentos dos indivíduos de <i>Prochilodus lineatus</i>	73
Figura 13	Análise de coordenadas principais (PCoA), realizado sobre a distância euclidiana dos genótipos em 15 <i>loci</i> microsatélites.....	73
Figura 14	Gráfico demonstrando a proporção de variação cumulativa explicada pela retenção de componentes principais.....	74

Figura 15	Valores de BIC, critério de informação Bayesiana <i>versus</i> número de <i>clusters</i> da análise de componentes principais em <i>Prochilodus lineatus</i> do alto rio Grande, MG.....	75
Figura 16	Resultado da DAPC, definindo dois aglomerados principais.....	76
Figura 17	Resultados da classificação DAPC dos 140 indivíduos como tendo origem genética nos aglomerados 1 ou 2.....	76
Figura 18	Representação gráfica da distribuição dos indivíduos em cada cluster de acordo classificação realizada pelo DAPC.....	77
Figura 19	Gráfico de concordância entre <i>clusters</i> definidos na DAPC e amostras populacionais (Pop1= Camargos, Pop2= Itutinga1, Pop3= Itutinga2. Pop 4= Funil.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de referência de PCR padrão para testes de marcadores microssatélites em <i>Prochilodus lineatus</i>	26
Tabela 2	Resumo Novos <i>loci</i> microssatélites caracterizados e avaliados como marcadores moleculares de DNA para a espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	29
Tabela 3	Amostragem populacional de <i>Prochilodus lineatus</i> e suas respectivas localidades na bacia do alto rio Grande, MG.....	49
Tabela 4	Resultados de diversidade genética para cada marcador microssatélite nas quatro amostras populacionais de <i>P. lineatus</i>	55
Tabela 5	Análise de variância molecular (AMOVA) das localidades amostradas e momentos (amostras populacionais) para o <i>Prochilodus lineatus</i>	58
Tabela 6	Resumo dos índices de fixação par-a-par para os valores de diversidade de microssatélites entre as amostras populacionais.....	58
Tabela 7	Distância genética D de Jost para comparações de pares de amostras populacionais de <i>Prochilodus lineatus</i>	59
Tabela 8	Diversidade genética intrapopulacional (média sobre <i>loci</i>) para cada <i>cluster</i> definido na análise hierárquica da estrutura genética de <i>Prochilodus lineatus</i> ...	66
Tabela 9	Índices de fixação pareada para <i>clusters</i> definidos pela análise MLE de admistura de 1ª ordem ($K_T=2$), para <i>Prochilodus lineatus</i> do alto rio Grande, MG.....	66
Tabela 10	Índices de fixação pareada para <i>clusters</i> definidos pela análise MLE hierárquica de admistura de 2ª ordem ($K_T=4$) para <i>Prochilodus lineatus</i> do alto rio Grande, MG.....	67
Tabela 11	Índices de fixação pareada (F_{ST} e G_{ST}) para <i>clusters</i> definidos pela análise MLE hierárquica de admistura de 3ª ordem ($K_T=8$), para <i>Prochilodus lineatus</i> do alto rio Grande, MG.....	68
Tabela 12	Resumo dos índices de fixação (G'_{ST} e G''_{ST}) pareada para valores de diversidade de microssatélites entre <i>clusters</i> hierárquicos de 3ª ordem ($K_T=8$) para <i>Prochilodus lineatus</i> do alto rio Grande, MG.....	69
Tabela 13	D de Jost para comparações de pares para amostras populacionais hierárquicas (cluster de 1ª ordem) de <i>Prochilodus lineatus</i>	69
Tabela 14	D de Jost para comparações de pares para amostras populacionais hierárquicas (cluster de 2ª ordem) de <i>Prochilodus lineatus</i>	69
Tabela 15	D de Jost para comparações de pares para amostras populacionais hierárquicas (cluster de 3ª ordem) de <i>Prochilodus lineatus</i>	70

Tabela 16 Estimativas de melhor K para análise com STRUCTURE, para 20 réplicas de K variando entre 1 e 8, baseado em três estimadores: Ln(DIK) de Pritchard, ΔK de Evanno e Parcimônia de Wang.....71

Tabela 17 Número de indivíduos atribuídos a cada cluster DAPC, por amostra populacional, dos 140 indivíduos de *Prochilodus lineatus*.....77

FIGURAS SUPLEMENTARES – APÊNDICE A

Figura 1 - Resolução eletroforética de PCR em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio, para amplificação de 20 amostras de <i>P. lineatus</i> coletado a montante da barragem de Itutinga em 2013.....	103
Figura 2 - Resolução eletroforética de PCR em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio, para amplificação de 20 amostras de <i>P. lineatus</i> coletado a montante da barragem de Itutinga em 2023.....	104
Figura 3 - Resolução eletroforética de PCR em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio, para amplificação de 20 amostras de <i>P. lineatus</i> coletado a montante da barragem de Itutinga em 2023.....	105
Figura 4 - Resolução eletroforética de PCR em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio, para amplificação de 20 amostras de <i>P. lineatus</i> coletado a montante da barragem de Funil em 2013.	106
Figura 5 - Amostra populacional de Camargos. Cada barra vertical indica um indivíduo da amostra	107
Figura 6 - Amostra populacional de Itutinga 1. Cada barra vertical indica um indivíduo da amostra	107
Figura 7 - Amostra populacional de Itutinga 2. Cada barra vertical indica um indivíduo da amostra	108
Figura 8 - Amostra populacional de Funil. Cada barra vertical indica um indivíduo da amostra	108

TABELAS SUPLEMENTARES – APÊNDICE B

Tabela 1 - Resultados da presença de alelos privados e suas respectivas frequências nas populações amostradas.....109

Tabela 2 - Informações de identificação dos indivíduos, populações amostradas a que pertencem e o cluster a que foi atribuído por meio da análise de agrupamentos hierárquica. Ordem de classificação a partir da identificação dos indivíduos amostrados.....110

Tabela 3- com informações de identificação dos indivíduos, populações amostradas a que pertencem e o cluster a que foi atribuído por meio da análise de agrupamentos hierárquica. Ordem de classificação a partir do cluster C3 contendo 8 agrupamentos genéticos.115

1. CAPITULO 1

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE *PROCHILODUS* *LINEATUS*

1.1 INTRODUÇÃO

A curimba, *Prochilodus lineatus* Valenciennes 1836 (Characiformes: Prochilodontidae), também conhecida como papa-terra, curimbatá, grumatá e curimatã (entre muitos outros nomes comuns), é uma espécie de peixe teleósteo cujo o gênero é amplamente distribuído em rios e bacias hidrográficas da América do Sul. *Prochilodus lineatus* ocorre na bacia do rio Paraíba do Sul e principalmente na grande bacia do rio da Prata, que inclui as bacias do rio Paraná, rio Paraguai e rio Uruguai (AGOSTINHO e PELICICE, 2007b, ESPINDOLA *et al.*, 2021). É uma das espécies migratórias de água doce mais significativas para a pesca comercial e de subsistência em várias regiões, sendo responsável por mais de 50% da biomassa pesqueira da bacia do rio da Paraná (CASTRO e VARI, 2003; BOWEN, 2022a; BOWEN, 2022b).

Prochilodus lineatus é um peixe detritívoro e possui boca conspícua, altamente adaptada à sua dieta (Figura 1). Pode ser encontrado em uma variedade de habitats de água doce, incluindo rios de correnteza rápida, planícies de inundação e lagos marginais (CASTRO e VARI, 2004). Esta é uma das espécies que realiza longas migrações reprodutivas conhecidas como "piracema", a movimentação à montante desencadeada durante a cheia dos rios, que ocorre no período de dezembro e março (CAROLSFELD *et al.*, 2003).



Figura 1 – Exemplar de curimba (*Prochilodus lineatus*) no seu ambiente natural, em Bonito, MS. Repare o aparelho bucal característico, em forma de funil invertido. Autoria: Dr. André Seale (*University of Hawaii*).

Peixes migratórios Neotropicais enfrentam diversas ameaças, incluindo a degradação do habitat, poluição da água e a construção de barragens que impedem suas migrações (REIS *et al.*, 2016). A variabilidade genética é fundamental para a sobrevivência e adaptação das espécies (KARDOS, 2021) promovendo a resiliência contra mudanças ambientais e pressões seletivas (FRANKHAM *et al.* 2008; STANGE, 2020). Em espécies potamódromas (*i.e.*, que migram ao longo do rio), a distribuição da variabilidade genética está associada às suas extensas migrações reprodutivas, que promovem o fluxo gênico entre populações, através do cruzamento de indivíduos originados em diferentes localidades. Isso reduz suas diferenças genéticas (tendência à panmixia, ou acasalamentos aleatórios ao longo da bacia), favorece altas taxas de diversidade intrapopulacional e reduz os problemas associados à perda de diversidade genética, ao aumento das taxas de endogamia (acasalamentos consanguíneos) e à fixação de alelos deletérios (ASHIKAGA, 2013; THALINGER *et al.*, 2019).

A construção de barragens em rios fragmenta os habitats aquáticos e interrompe as rotas migratórias de espécies como *P. lineatus*. A fragmentação dos corpos d'água impede que os peixes alcancem suas áreas de desova, resultando em uma redução drástica no fluxo gênico entre populações, culminando na diminuição da variabilidade genética (SOUSA, 2021) e, conseqüentemente, pode comprometer a capacidade da espécie de responder a mudanças ambientais e pressões seletivas, aumentando o risco de extinção local (GOMEZ e PEREIRA, 2017). Ademais, a redução nas populações devido à fragmentação genética pode levar a um declínio nas capturas, impactando a segurança alimentar e a economia local (AGOSTINHO *et al.*, 2007b).

A promoção de pesquisas genéticas contínuas com uso de marcadores moleculares de DNA (ácido desoxirribonucleico) é fundamental para monitorar a diversidade genética das populações e subsidiar estratégias de conservação e manejo sustentável da espécie (AGOSTINHO *et al.*, 2007a). Marcadores moleculares compreendem técnicas que permitem a avaliação de partes específicas de segmentos do DNA que contém polimorfismos, de sequência ou de comprimento de fragmentos (SCHLÖTTERER, 2004; FRANKHAM *et al.*, 2008). Entre estes, os marcadores de DNA microssatélites são de especial interesse para os ecólogos, pois permitem aos pesquisadores uma compreensão detalhada das questões populacionais em escala fina. Microssatélites apresentam altas taxas de mutação, o que resulta em altos níveis de diversidade alélica (*i.e.*, diversos alelos diferentes em um mesmo *locus*), o que aumenta

a informatividade nas análises para estudos genéticos de processos que operam em escalas de tempo ecológico (SCHLÖTTERER, 2004).

1.1.2 Marcadores moleculares: Marcadores de microssatélites de DNA

Microssatélites, também chamados de repetições de sequência simples (SSR), são temas curtos e repetidos de sequências de DNA *in tandem* (i.e. lado-a-lado), de dois a seis pares de base, que comumente variam no número de repetições em diferentes alelos de um *locus*, gerando polimorfismo de tamanho de fragmentos de DNA (SRIVASTAVA *et al.*, 2019; LEI *et al.*, 2021). O uso de microssatélites para estudos moleculares e ecológicos tradicionalmente se destaca quando comparado a outros tipos de marcadores como aloenzimas, polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) e polimorfismos nucleares únicos (SNP) (SELKOE; TOONEN, 2006) e, apesar destes terem ganhado *momentum* devido ao emprego crescente de técnicas baseadas em genotipagem por sequenciamento, permanecem relevantes e com característica complementares a outros tipos de marcador (SUNDE *et al.*, 2020). Como esses marcadores têm relativa facilidade de aplicação através da análise do comprimento de fragmentos de DNA, os microssatélites têm sido amplamente aplicados em estudos de diversidade genética e delimitação de populações, além de outras aplicações como mapeamento por análise de recombinantes, exames de paternidade e parentesco, identificação forense, determinação de sistemas de acasalamento, detecção de migrantes, híbridos, entre outras (SCHLÖTTERER, 2004; BUDOWLE e SAJANTILA, 2024). O uso de ferramentas moleculares viabiliza práticas de gestão ambiental sustentáveis, no contexto da produção energética e dos seus impactos sobre a ictiofauna migratória (e.g. OLIVEIRA-FARIAS *et al.*, 2022). A pesquisa e monitoramento contínuos são essenciais para a conservação da biodiversidade aquática Neotropical, especialmente diante das pressões antropogênicas que ameaçam essas espécies. O uso de genômica e biotecnologia tem potencial para melhorar nossa compreensão e capacidade de preservar essas espécies únicas e ecossistemas vitais (JACOBINA *et al.*, 2018).

Os microssatélites se caracterizam por serem espécie–específicos, de herança mendeliana, codominantes, abundantes nos genomas eucarióticos e facilmente detectado por PCR (reação em cadeia da polimerase). Isso resulta em uma ferramenta molecular prática, de baixo custo, eficiente e altamente informativa para diversos estudos ecológicos (SELKOE; TOONEN, 2006), razões pelas quais tem sido amplamente usado para estudos

de diversidade e estrutura genética de populações naturais de diversas espécies, dentre elas *Prochilodus lineatus* (ver Capítulo 2).

Os marcadores de DNA microssatélites permitem rotinas de genotipagem relativamente simples, sendo adequados para operações cotidianas de pisciculturas ou monitoramento de estoques selvagens, pois facilitam diversas aplicações práticas na produção de peixes para fins ambientais ou comerciais, incluindo genotipagem de rotina e análise de variação genética (WENNE, 2023). O uso destes marcadores pode ajudar a elucidar questões como a influência do barramento no isolamento genético dos peixes (e.g. RUZICH *et al.*, 2019); efetividade dos mecanismos de transposição na manutenção do fluxo gênico (e.g. WILKES *et al.*, 2019); no planejamento e na avaliação de eficiência de iniciativas de repovoamento de áreas impactadas (e.g. OSATHANUNKUL e SUWANNAPOOM, 2023); e alteração dos estoques ou comprometimento nas adaptações locais (e.g. SHEDD *et al.*, 2022).

Para a abordagem adequada dessas questões são necessários planejamentos cuidadosos, que incluem desenhos experimentais e amostrais apropriados, além da disponibilidade de ferramentas práticas e analíticas. Isso envolve um número e variedade adequados de diferentes marcadores moleculares, bem como modelos conceituais e quantitativos da genética e ecologia populacional desses sistemas (e.g. DAVIS *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2018).

Uma das tradicionais limitações destes marcadores é a necessidade de desenvolvimento *de novo* para espécies de interesse, processos custosos, elaborados e de baixo rendimento (revisados em ZANE *et al.*, 2002). Isso mudou dramaticamente com o advento de sequenciamento de nova geração (NGS), um conjunto de técnicas de alto-rendimento e baixo custo para obtenção de dados de sequências de DNA, possibilitando o acúmulo de números cada vez maiores de marcadores microssatélites disponíveis (YAZBECK *et al.*, 2024), caracterizados principalmente pela descrição de pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a PCR.

Um total de 18 *loci* específicos de microssatélites validados estão disponíveis até o momento para a espécie *P. lineatus*, uma espécie diploide com $2N=54$ cromossomos (STORNIOLI *et al.*, 2021). Cinco marcadores microssatélites foram descritos por Yazbeck e Kalapothakis (2007) e outros 13 apresentados em Rueda *et al.* (2011). Estes têm sido usados em diversas investigações genéticas nesta espécie (e.g. RUEDA *et al.* 2013; FERREIRA *et al.* 2017; SOUZA *et al.* 2017; LOPERA-BARRERO *et al.* 2019; RIBOLLI *et al.* 2020; PERINI *et al.* 2021; ROSA *et al.* 2022; FERREIRA *et al.* 2023).

Dessa forma, a disponibilização de novos marcadores moleculares aumenta o poder inferência de estudos ecológicos e iniciativas e de conservação da ictiofauna em ecossistemas impactados. Kalinowski (2005), enfatiza a importância do uso de *loci* polimórficos suficientemente informativos, com dados genéticos robustos e confiáveis. Este é um passo necessário para alcançar o objetivo de sustentabilidade da pesca em regiões intensamente alteradas pela atividade humana (AGOSTINHO *et al.*, 2007), especialmente pela geração de energia hidrelétrica, ocupação de terras, poluição industrial, urbana e agrícola, além da introdução de espécies invasoras (REIS *et al.*, 2016).

1.2 OBJETIVO

1.2.1 Objetivo Geral

Este estudo se propõe a desenvolver marcadores moleculares de DNA microssatélites para a espécie *Prochilodus lineatus*, uma das principais espécies para a pesca na bacia do Rio Paraná.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Aplicar dados NGS de caracterização de potenciais *loci* marcadores de DNA microssatélites para validar novos marcadores moleculares polimórficos na espécie *P. lineatus*;
- Desenvolver e padronizar ensaios PCR para os novos marcadores microssatélites polimórficos nesta espécie; e;
- Apresentar pares de *primers* e condições de PCR para a aplicação de novos microssatélites em pesquisas genéticas e no gerenciamento ambiental de *P. lineatus*.

1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1. Isolamento e caracterização de novos marcadores microssatélites

Os *loci* microssatélites potenciais foram escolhidos a partir de um painel ainda inédito de dezenas de milhares de candidatos, obtidos por técnicas NGS, previamente desenvolvido (resultados em preparação) no Laboratório de Recursos Genéticos (LARGE-UFSJ - www.ufsj.edu.br/large). Os detalhes metodológicos de obtenção do painel são semelhantes aos apresentados em Yazbeck *et al.* (2018) e Graciano *et al.* (2022). Os critérios adotados para o desenho dos *primers* para PCR foram: tamanho variando entre 18 e 28 pb, faixa de conteúdo CG entre 40% e 60%, temperatura de anelamento entre 57 e 65°C.

Foram polimerizados 22 pares de sequências de *primers*, sendo 12 por meio da empresa IDT (Integration DNA Technologies) e outros 10 através da XX (Exxtende – Solução em Oligos). Os procedimentos de teste e validação foram feitos em um conjunto inicial de quatro espécimes de três populações (localidades) amostradas na natureza, no curso do rio, e depositadas no Banco de DNA do LARGE-UFSJ.

Os marcadores efetivamente desenvolvidos foram então aplicados em amostras de DNA de um conjunto de 140 indivíduos de *P. lineatus* dessas três localidades do alto rio Grande amostradas em 2013: reservatório da Usina Hidrelétrica (UHE) de Camargos; à jusante da barragem da UHE do Funil; e reservatório da UHE de Itutinga, sendo esta amostrada novamente em 2023. Mais detalhes dos locais e do número de amostras são apresentados na Tabela 3. A variação de comprimento de fragmentos de DNA amplificados foi obtida do total dos indivíduos, de onde foram caracterizadas as classes alélicas para cada marcador de DNA microssatélite (dados detalhados no Capítulo 2).

1.3.2. Extração DNA genômico

O DNA genômico das amostras foi obtido a partir da extração realizada de acordo com o protocolo de Chelex (WALSH, 1991), onde, um pequeno fragmento (5 mm²), devidamente identificado, é imerso em uma solução contendo 200µl de mistura heterogênea aquosa de resina Chelex a 5%, 2 µl de Proteinase-K colocados em microtubos de 1,5 ml. A solução foi submetida a agitação em vortex por 10 segundos e depois centrifugada a 13.000 rpm por 2 min. Logo após, colocada no termociclador e aquecida a 56°C por 38 min para a digestão proteica e, em seguida, a 98°C por 8 min para desnaturar a Proteinase-K. Posteriormente, a solução foi submetida a centrifugação por 3

min a 13000 rpm. As amostras foram diluídas na proporção 1:10 em água ultrapura e armazenadas a 4°C. foram usados DNA de 12 espécimes de *P. lineatus* para essa fase.

1.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese

A otimização da PCR seguiu critérios de ajustes das condições específicas para se obter o melhor resultado de cada marcador, a partir de testes e ajustando-se a quantidade de MgCl₂, *primers*, polimerase de DNA *Taq* e temperaturas ótimas de anelamento, determinadas por PCR de gradiente de temperatura (50° a 70°). As reações tiveram volume final de 10 µl (Tabela 1). O programa de termociclagem da PCR consistiu nas seguintes etapas: i) temperatura inicial de incubação a 94°C por 4 min; seguido pela repetição de 30 ciclos de; ii) desnaturação da dupla-fita de DNA genômico da amostra a 94°C por 30 s; iii) anelamento de pares de *primers* específicos, variando de 45 a 62°C, por 30 s; e iv) extensão a 72°C por 30 s; além de um passo final de alongamento a 72°C por 5 min que. A reação foi conduzida em um termociclador Long Gene 96G.

Tabela 1 – Valores de referência de PCR padrão para testes de marcadores microsatélites em *Prochilodus lineatus*.

Reagentes	Concentração final
Tampão 10x	2µl
MgCl	0,5µl
DNTP	0,1µl
<i>Primer F</i>	0,3µM
<i>Primer R</i>	0,3µM
TBT -PAR	2,1µl
<i>Taq</i> 5u/µl	0,2µl
H ₂ O	3,7µl
DNA	1µl

Os produtos de PCR foram avaliados através dos resultados obtidos em gel de poliacrilamida a 10% (19:1 acrilamida/bis acrilamida) em tampão TAE 1x (tris base, ácido acético e EDTA). Cada amostra recebeu 3 µl de tampão de carregamento de gel azul de bromofenol. Foram aplicados 5 µl de produto de PCR para cada espécime em canaletas individuais do gel vertical (20 cm de separação entre eletrodos), e em seguida submetidos à eletroforese para separação dos fragmentos de DNA amplificados. Foi usado como referência, aplicado ao centro do gel, o padrão de peso molecular conhecido de 100 pb

(Analytikjena/Biometria) para determinação posterior do tamanho dos fragmentos. Cada corrida durou em média 3 a 4 h a uma voltagem de 150 a 170 V (7,5 a 8,5 V/cm). Posteriormente, os géis foram corados em uma solução de 0,005% de brometo de etídio por 20 minutos e depois lavados em água deionizada por 20 minutos para retirada do excesso de corante. Os géis foram, então, visualizados por meio do transiluminador, que emite luz ultravioleta (faixa de luz entre 380 e 420 nm). As imagens foram registradas usando sistema digital L-PIX Image – versão: 1.21 (Loccus biotecnologia), e visualmente avaliadas quanto à qualidade da amplificação e presença de polimorfismo.

1.4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Do total de 22 *loci* potenciais testados, cinco (Prol14, Prol15, Prol18, Prol31 e Prol52) resultaram em padrões de amplificação complexos e foram abandonados para este estudo e dois (Prol65 e Prol28) não apresentaram resultados observáveis. Um total de 15 *loci* testados viabilizaram a validação de marcadores microssatélites, pois obtiveram amplificações polimórficas consistentes. Sendo que reações com 11 pares de iniciadores foram inicialmente otimizados com o auxílio da então aluna de mestrado do PPGBiotec-UFSJ, Leiliane Campos de Carvalho (Prol01, Prol02, Prol03, Prol04, Prol05, Prol06, Prol07, Prol08, Prol10, Prol11 e Prol12), e, os demais, apenas pela autora. Dentre os marcadores otimizados, nove têm temas de repetições de quatro nucleotídeos (tetranucleotídeos), cinco são trinucleotídeos e um é do tipo dinucleotídeo. Estes resultados estão apresentados na Tabela 2, incluindo os pares de *primers* e as condições necessárias iniciais para a aplicação destes novos marcadores em outros estudos.

O comprimento de fragmentos de DNA observados variou de 87 a 389 pb, os quais foram agrupados em 341 classes alélicas nominais, no conjunto dos *loci* (mais detalhes são apresentados no capítulo 2). O número de alelos caracterizados nos 15 novos *loci* variou de 13 a 31, com uma média de 22,7 ($\pm 1,3$ erro padrão da amostra - EP). Imagens ilustrativas com exemplos de marcadores desenvolvidos neste trabalho podem ser vistas no Apêndice A (Figuras 1 a 4).

Tabela 2 – Novos *loci* microssatélites caracterizados e validados como marcadores moleculares de DNA para *Prochilodus lineatus*. T.A.=Temperatura de anelamento; PCR= condições específicas de PCR; Bandas=faixa de tamanho de fragmentos amplificados; N_a=Número de alelos caracterizados e N=número de indivíduos amplificados/genotipados dentre 140 amostras.

Locus	Primers	Tema	T.A. (°C)	Pcr	Bandas (Pb)	N_a	N
Prol01	F: CAAAAGAAAACGAAAATAAAAGAAACA R: CCCTCTGGGATCAATATAGTATGTATGT	AGAT	54,0	Padrão	109-261	24	117
Prol02	F: TTAAACTCATTCAACCGGCCTAC R: GTTGGAGGTTACTTGATAGGGAGGTA	TATC	54,0	primer (0,2 µl)	113-389	24	119
Prol03	F: TTCCCCATCTTTAGAAATGTCCTTC R: CTCCTGGGGATAAACCATCAATCT	AGAT	63,6	Padrão	134-375	27	122
Prol04	F: TCTGAAACTATTTTTATAGGTAGGGGGA R: TCCTCTCACCTACAACTTCCTCAA	TAA	56,4	Padrão	113-264	25	125
Prol05	F: TCTATCCATCCAATCTATCCATCCA R: AAATTCCATAGTTTGGAGTGACGC	ATCT	58,8	Padrão	89-276	31	114
Prol06	F: GGCCACTATAAAAGGTAGGCACAA R: CATA CGCTGTCCTAAATGTT CAGC	AGAT	54,0	Padrão	121-227	17	104
Prol07	F: TGGAGGCTGCAGGTATAAGTTTTT R: AAGGCTGGTTCCCTAACCTCC	TTA	56,4	Padrão	102-205	20	94
Prol08	F: AAGGGCAAGATCAGACAAACAAG R: GAATACTACGCTCATTT CAGAAGAAAAA	TAT	63,6	Padrão	146-288	16	122
Prol10	F: CACAGACAGACACATATGGGGA R: CAGGTATGTTCTATTGAAATGCTAACAC	AT	61,2	Padrão	145-316	25	100
Prol11	F: AGAGCTTCAATAGGCTGAAGTCGT R: TGAATTTCCCTCTGGGATCAATAA	TAGA	56,4	Padrão	113-222	23	110
Prol12	F: GTTGCACCTTTGTAGAGGGGTATG R: ACAGCCGTGGATATAGTCAGAAGC	TCA	56,4	Padrão	117-280	23	107
Prol19	F: TAAAATGTGGTTTCCTGTGCAATG R: TTTGCATTTTATCCATCTTTTCCC	TAGA	60,0	primer (0,2 µl)/ 35 ciclos	87-200	18	106
Prol53	F: ATTGCCTGTGTCACCTAAGCATGT R: TGCTACTGGCTGCTAAATTTCCCTT	AGAT	51,0	Padrão	127-209	13	137

Pro154	F: CGAGACGTCTAGCTGACACCATAA R: TTGACTTCTTGCTGTCATGTCAAA	AGAT	49,0	Padrão/ 35 ciclos	96-309	28	110
Pro157	F: AATGAAACACAGTCAGGCTCCTTC R: TTCCTTCAGGCAATGCACTTTTAT	ATA	49,0	Padrão	139-317	27	122

Houve uma taxa relativamente satisfatória de sucesso no teste de novos marcadores, 15 dos 22 candidatos testados, ou cerca de 68%, sendo dois marcadores nulos e cinco marcadores passíveis de otimização adicional. Isso atesta a qualidade das abordagens NGS em fornecer dados de sequências genéticas, de onde potenciais *loci* microssatélite pode ser caracterizados para testes. Os dois *loci* potências que não amplificaram podem ser fruto de erro na montagem de fragmentos genômicos dos dados NGS (e.g. junção “quimérica” de diferentes regiões duplicadas e semelhantes do genoma). Já os potenciais marcadores que geraram padrões complexos, podem sofrer de tendência à formação de heteroduplex (duplas-fitas de DNA com anelamento cruzado de temas repetitivos de diferentes alelos homólogos de um *locus*) ou, ainda, serem *loci* conservados e duplicados no genoma desta espécie. Porém ambos os casos podem ser, ainda, passíveis de tentativas de futura otimização e resgate destes potenciais novos marcadores e para verificação destas possibilidades.

A taxa de falha na amplificação/genotipagem (*i.e.*, ou não amplificou na PCR, ou o padrão de bandas foi considerado dúbio e não computado) variou de 2,1% (Prol53) a 32,8% (Prol07), com uma média de 18,6% ($\pm 7,9$ EP), incluindo casos em que apenas um alelo foi identificado e o outro foi considerado indeterminado para o mesmo genótipo diplóide. Esse fenômeno pode ter múltiplas causas, como a qualidade do DNA e de sua extração, problemas durante as etapas de otimização da PCR, variação entre equipamentos usados e qualidade dos reagentes, em especial da *Taq* DNA Polimerase (PIYAMONGKOL *et al.*, 2003; SHAGIN *et al.*, 2017). Por precaução, a tipagem de alelos foi sempre marcada com dados faltantes quando dúbios, o que explica em parte os valores observados de falhas em genotipagem.

Estes novos marcadores microssatélites aumentam em cerca de 83% o número de *loci* previamente validados disponíveis para a pesquisa e aplicação nesta espécie e apresenta o maior conjunto já publicado em uma iniciativa, frente aos trabalhos de Yazbeck e Kalapothakis (2007) e Rueda *et al.* (2011). Em adição aos 18 *loci* anteriormente descritos, agora a comunidade de cientistas e gestores ambientais dispõe de um repertório total de 33 microssatélites para aplicação imediata e de baixo custo em *P. lineatus*.

De acordo com Selkoe e Toonen (2006), cada *locus* pode ser visto como uma unidade amostral de diferentes regiões do genoma. Portanto, ao combinar os resultados de vários *loci* é possível obter-se uma amostragem genômica mais representativa,

proporcionando métodos mais precisos e estatisticamente poderosos para a comparação entre populações e indivíduos.

Um estudo de Wang *et al.* (2021) sugere que a aplicação de menos de 12 ou 11 marcadores microssatélites leva a um viés importante nas avaliações da estrutura genética populacional. Um número substancial de microssatélites é necessário para permitir estudos de associação e mapeamento genético baseado em recombinação, para o desenvolvimento de *loci* de características quantitativas e outras aplicações (BAHRAM e INOKO, 2007) e os resultados do presente trabalho contribuem para essas finalidades.

Seguramente, esses novos marcadores de DNA microssatélite caracterizados e validados aqui serão úteis para diversos grupos de pesquisadores e gestores ambientais que se interessam pelas questões ecológicas populacionais envolvendo a investigação e considerações genéticas em *P. lineatus*. Esta espécie é uma candidata natural de organismo modelo adequado para os estudos dos impactos e avaliação da eficiência de diferentes medidas mitigatórias em populações de peixes de piracema, no contexto da exploração hidrelétrica e outras pressões antrópicas em geral. O entendimento destes fatores é essencial para o manejo e o planejamento efetivo da gestão dos recursos hídricos e pesqueiros.

1.5 CONCLUSÃO

- Um total de 15 novos marcadores moleculares de DNA microssatélites para *Prochilodus lineatus* foi empiricamente validado e disponibilizado para a comunidade científica e de gerenciamento ambiental de recursos hídricos e pesqueiros;
- Este é o maior conjunto de tais marcadores já disponibilizados em uma única iniciativa para este peixe e aumenta de forma importante (quase dobra) o número de microssatélites validados disponíveis; e
- Os resultados apresentados aqui certamente irão beneficiar a pesquisa ecológica e genético-populacional, por diversos grupos interessados em investigar a biologia, básica, ou mensurar e mitigar impactos ambientais sobre esta espécie de piracema, um modelo adequado para estudo do gerenciamento da ictiofauna migratória, no contexto da exploração hidrelétrica.

2. CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PROCHILODUS LINEATUS* EM REGIÕES SOB INFLUÊNCIA DE BARRAGENS DE HIDRELÉTRICAS NO SISTEMA DO ALTO RIO GRANDE – MG

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. Sub-bacia do rio Grande

Com o crescimento demográfico e econômico nacional, houve um aumento crescente na demanda por energia elétrica. Para atender a essa necessidade diversas UHE foram implantadas em bacias hidrográficas por todo o país (Perini, 2013). De acordo com o levantamento feito por Agostinho *et al.* (2007b), o Brasil possui ao longo do seu território mais de 700 grandes reservatórios hídricos.

Situada na região sudeste do Brasil, entre os estados de Minas Gerais e São Paulo, a bacia do rio Grande está dividida em três regiões fisiográficas: baixo, médio e alto rio Grande. Está inserida dentro da bacia do rio Paraná, a segunda maior bacia do Brasil, com área de 3,1 milhões de km², o que corresponde a 17% do território da América do Sul. Desse total, 161.000 Km² é ocupado pela sub-bacia do rio Grande (IBGE, 2021), que abrange uma população humana de cerca de 8,6 milhões de habitantes, distribuídos em 393 municípios, dos quais 325 são ribeirinhos, inseridos no seu curso de drenagem (PORTO *et al.*, 2008, p.45).

A sub bacia do rio Grande desempenha papel crucial na hidrografia, ecologia e economia da região sudeste do Brasil, fornecendo água para irrigação (um dos principais usos do fluxo superficial do rio), consumo por animais e abastecimento urbano, rural e industrial, além da produção energética (MENEZES, 2011). Segundo informações do relatório da CEMIG (dados de 2020 - www.cemig.com.br), a bacia do rio Grande é responsável por 67% de toda a energia produzida em Minas Gerais e 12,3% da produção nacional.

A nascente do rio Grande está localizada em Minas Gerais, na serra da Mantiqueira a uma altitude de 1.239 m. Nessa região a geomorfologia é marcada por escarpas e reversos planaltos com altitude variando de 800 a 2.700 m. Percorre 1.360 km até sua confluência com o Rio Paranaíba, onde ambos coalescem formando o Rio Paraná (um importante componente da Bacia do Prata). Os principais afluentes do rio Grande incluem os rios Aiuruoca, Lourenço Velho, das Mortes, Jacaré, Verde, Sapucaí, Canoas, Pardo e Turvo (PEREIRA *et al.*, 2020).

É um exemplo ilustrativo de rio intensamente represado, com 12 grandes barragens, sendo estas distribuídas em três regiões: I) Baixo rio Grande, com as usinas de Marimondo e Água Vermelha; II) Médio, contendo as UHE de Furnas, Peixoto, Estreito, Jaguará, Igarapava, Volta Grande e Porto Colômbia; III) Alto rio Grande, onde estão localizadas as UHE de Camargos, Itutinga e Funil (PAIVA *et al.*, 2002). Esses

empreendimentos começaram a ser construídos a partir dos anos 50, visando contornar uma crise energética do país. A bacia do Paraná é responsável por 56% da produção energética nacional (PNE, 2007). Além disso, existem também 14 centrais geradoras hidrelétricas - CGHs e 41 pequenas centrais hidrelétricas – PCHs, as quais encontram-se distribuídas nos afluentes do rio Grande. A capacidade de produção energética, considerando todas as hidrelétricas – em operação, paralisada, desativada ou em outorga, – é de 7.797.362,76 KW (95,76% referentes às UHEs, 4,14% às PCHs e 0,10% às CGHs (dados do RELATÓRIO TÉCNICO Nº 96.581-205, 2008). As represas das UHEs presentes no rio Grande são mostradas na Figura 2.

Um aspecto crucial para viabilizar recursos destinados a estudos genéticos da ictiofauna migratória, como marcadores de DNA, é o potencial não explorado de aproveitamento hidrelétrico latente em Minas Gerais e região, especialmente no contexto do debate sobre matrizes e transição energética no Brasil do século XXI. Caso essa opção de exploração seja escolhida, é fundamental que estudos genético-ecológicos sejam conduzidos para informar ações, prever potenciais impactos negativos e subsidiar políticas em prol do desenvolvimento sustentável.

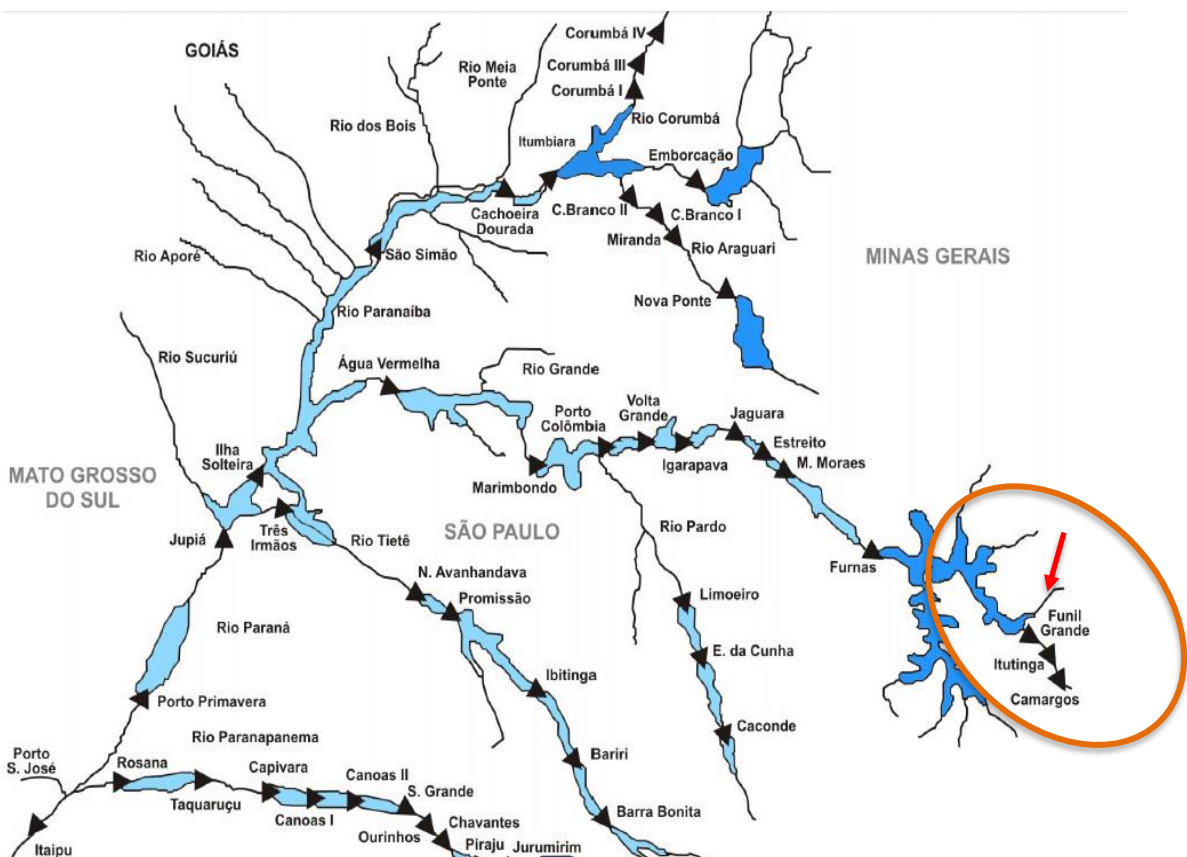


Figura 2 – Mapa mostrando as principais Usinas Hidrelétricas na região da Bacia do Paraná e seus principais afluentes. Em destaque, as três Usinas Hidrelétricas presentes na porção do alto rio Grande, locais fonte da pesquisa deste trabalho. A seta vermelha indica o rio das Mortes, importante tributário do rio Grande. Fonte: ONS - Plano Anual de Preservação das cheias - 2011/2012, modificada pela autora.

A diversidade de ambientes terrestres e aquáticos oportuniza uma rica biodiversidade de flora e fauna Neotropical, incluindo espécies endêmicas e ameaçadas de extinção, sendo a ictiofauna de água doce da América do Sul a mais megadiversa do planeta (CASSEMIRO *et al.* 2023). A bacia do Prata, na qual está inserido o rio Grande, representa a terceira bacia em termos de ictiofauna mais biodiversa da América do Sul, nela são encontradas 44 famílias, distribuídas em 242 gêneros e 924 espécies, das quais 444 espécies são endêmicas (REIS *et al.*, 2018). Desse total, ao menos 166 espécies de peixes nativos são registradas na bacia do rio Grande (SALLENAVE, 2018). No entanto, o estado de conservação dessas espécies vem sofrendo crescente ameaça devido à degradação do seu habitat, poluição, mudanças no uso do solo e alterações no fluxo hidrológico, como no desvio de água para irrigação e na implementação de barragens hidrelétricas (REIS *et al.*, 2018).

2.1.2 Usinas hidrelétricas e a ictiofauna Neotropical

Os mananciais de água doce apresentam fauna ictiológica mais diversa do mundo, e também estão entre os ecossistemas mais impactados devido às ações antrópicas (PEREIRA *et al.*, 2020), compondo entre 20% e 25% da fauna total de peixes dulcícolas do planeta (PEREIRA *et al.*, 2013). De acordo com Dagosta *et al.* (2020), já foram descritas cerca de 6.200 espécies Neotropicais, com estimativa de mais de 9000 (CASTRO e POLAZ, 2020), das quais 2.587 com registro de ocorrência no Brasil. Dessas, 161 espécies, distribuídas em 21 famílias, ocorrem na bacia do rio Grande (PAIVA *et al.*, 2002). Cerca de 80% dessas espécies pertencem a três ordens principais: Characiformes, Siluriformes e Perciformes (PEREIRA *et al.*, 2013). A presença de espécies como o dourado (*Salminus brasiliensis*) e curimba (*Prochilodus lineatus*) demonstra que o rio Grande é uma importante rota migratória e área de reprodução de espécies de piracema (CESÁRIO, 2010).

Esses peixes habitam uma variedade de ambientes aquáticos, desde pequenos riachos até grandes rios e lagoas. A crescente fragmentação desse ecossistema causa modificações nos ambientes bióticos e abióticos, e leva à diminuição da biodiversidade da fauna e flora nativas (AGOSTINHO *et al.*, 2007). Segundo Darwall *et al.* (2018), os ecossistemas de água doce enfrentam uma “crise de biodiversidade”, reflexo do uso irresponsável e indiscriminado da água que culminaram em declínios catastróficos em espécies dulcícolas e a destruição de seus habitats, abarcando sua diversidade genética e funcional. Ainda segundo o autor, as causas proeminentes da destruição dos ecossistemas de água doce incluem a degradação e perda de habitat, superexploração, introdução de espécies invasoras, mudanças climáticas, poluição e alterações nos cursos hidrológicos.

Particularmente, a implementação de UHEs pode interferir significativamente na biologia reprodutiva de peixes migratórios, causando assim diversos impactos potenciais para a sua conservação, pois dependem da migração para atingir a maturação sexual e conseguir reproduzir-se em condições naturais (AGOSTINHO *et al.*, 2007; DAVIES *et al.*, 2008). Isso evidencia a importância de estudos ambientais, sobretudo de comunidades e populações de peixes migratórios quando relacionados à fragmentação dos cursos d'água (PORTO *et al.*, 2017). Um dos danos mais significativos causados pelo barramento sobre espécies migradoras está relacionado ao impedimento ou atraso no movimento dos peixes até as cabeceiras dos rios, impossibilitando a sua reprodução. Condições como

temperatura, nível da água, transparência alteradas pela presença de barramento afetam diretamente a distribuição de espécies de peixes o que pode ter influência nas relações ecológicas locais, como por exemplo, a presença de espécies não nativas piscívoras (SILVA-SENE, 2022).

Ademais, a construção de reservatórios “sequestram” nutrientes dos ecossistemas a jusantes das barragens. Assim, a retenção de nutrientes pode, em médio e longo prazo, tornar os ecossistemas a jusante menos produtivos e, conseqüentemente, menos capazes de sustentar uma rica biodiversidade e seus serviços ecossistêmicos, com destaque para a pesca (CALHEIROS *et al.* 2009; FANTIN-CRUZ *et al.* 2016; MAAVARA *et al.* 2014, 2015, 2017; VAN CAPPELLEN e MAAVARA 2016). Outro impacto significativo da alteração imposta por barragens é a perda de lagoas marginais, importantes para a maturação de juvenis, nas estações intermediárias à piracema (PETRY *et al.*, 2003).

2.1.3 Mecanismos de Transposição de Peixes ou Sistemas de Transposição de Peixes e Peixamento

Na tentativa de mitigar os danos causados pelas construções de barragens nas populações de peixes migratórios, foi estabelecida em todo país a regulamentação para a construção de Mecanismos de Transposição de Peixes (MTP) ou Sistemas de Transposição de Peixes (STPs). Assim, em Minas Gerais a lei nº12.488 estabelece que sejam construídas estruturas hidráulicas, como escadas e elevadores, com a finalidade de permitir a passagem (subida/descida) desses animais. Na bacia do rio Grande, diversos MTPs e STPs têm sido implementados na tentativa de mitigar os impactos do barramento na migração de espécies aquáticas.

No entanto, a eficácia desses métodos é questionável e pode ser limitada. Alguns mecanismos como as escadas, por exemplo, são considerados ineficazes e até mesmo prejudiciais aos peixes, pois podem conduzir peixes a ambientes impactados e pouco adequados à reprodução (PELICICE e AGOSTINHO, 2008). Problemas como o não reconhecimento dessas passagens por meio dos peixes podem ocorrer e, ainda, podem ser feridos ou até mesmo mortos nesses locais devido a permanência prolongada. Ademais, muitas vezes podem ser seletivas, favorecendo apenas algumas espécies mais adaptadas aos novos desafios de navegação apresentados (KUSMA e FERREIRA, 2010; RODRIGUES, 2015). Uma pesquisa realizada por Suzuki *et al.* (2011), buscou avaliar a passagem de ovos e larvas através dos reservatórios de Itutinga, Camargos e Funil (considerando a existência de passagem de peixe nesta represa). Os resultados

mostraram ausência de ovos e larvas capturados a jusante destas barragens que pode ser um indicativo de impedimento ou dificuldade de passagem pela presença dessas estruturas. O que pode ser explicado pela formação de reservatórios lântico à montante das barragens além da mortalidade causada pelas turbinas.

Ainda neste viés, projetos em Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) têm utilizado canais laterais com bancos de pedras artificiais para simular condições naturais de rios na tentativa de facilitar a passagem de peixes com diferentes capacidades de natação, gerando menor impacto ambiental (COUTO e MAGALHÃES, 2016). Contudo, Lai *et al.* (2022) discute sobre os prejuízos ao ecossistema local a médio e longo prazo, como a diminuição da vazão do rio a jusante dessas estruturas

Outra estratégia usada no intuito de minimizar tais danos refere-se à técnica do peixamento, repovoamento ou estocagem de peixes. Essa técnica é amplamente usada na gestão de recuperação de ecossistemas aquáticos. Consiste na introdução de peixes em corpos d'água naturais ou artificiais com o objetivo de aumentar as populações de espécies nativas, promovendo o restabelecimento das funções ecossistêmicas e da biodiversidade (PISTER, 2001). A seleção das espécies para o recorte é um dos aspectos mais importantes, pois é necessário escolher espécies nativas adequadas às condições ecológicas locais, atentando-se para problemáticas como a introdução de espécies exóticas (BRAITHWAITE e SALVANES, 2010), assim como é crucial considerar a diversidade genética das populações para assegurar a resiliência e adaptabilidade dos organismos aos ambientes naturais (ARAKI e SHIMID, 2020).

A metodologia varia de acordo com os objetivos e as características locais. Em suma, as técnicas incluem a liberação direta de alevinos em áreas estratégicas, o transporte de adultos reprodutores para habitats adequados em condições reguladas para a reprodução natural (PISTER, 2001). A reprodução dos peixes migratórios é realizada por meio de indução hormonal (tipicamente com uso de extrato de hipófise de carpa). O cultivo dura até a fase de alevinos, quando são transferidos para rios. Essa prática, segundo os critérios da IUCN, estabelece que as populações criadas em cativeiro tenham no mínimo um número inicial de 20 a 30 espécimes, para garantir, assim, a sua efetividade (RIBEIRO *et al.*, 2015). No entanto, embora o peixamento tenha o potencial de promover a regeneração ecológica é necessário que se busque avaliar a estrutura genética dessas populações por meio de estudos moleculares, com o intuito de informar e concernir ações de repovoamento dos rios de maneira eficaz e benéfica à biodiversidade ictiológica. A soltura aleatória de animais criados em cativeiro pode acarretar, eventualmente, no

comprometimento da sobrevivência da espécie, impactos negativos sobre a estrutura genética das populações locais (RESENDE, 2001; LORENZEN *et al.*, 2012) ressaltando a necessidade de acompanhamento pós soltura desses animais.

Estas práticas de peixamentos foram amplamente abandonadas em alguns locais relevantes (por exemplo, Minas Gerais), durante a última década, em parte devido ao relaxamento geral de normativas para a proteção ambiental (ZELLHUBER, 2016), embora uma abordagem rigorosa, integrada e holística (ou seja, ecológica, genética e antropológica) ainda não tenha sido realizada sobre os potenciais benefícios ou problemas dessas atividades. Dado o seu status de principal peixe alvo de práticas de produção e soltura (*e.g.* SARAIVA e POMPEU, 2016), nos últimos 40 anos ou mais, é um candidato natural como espécie modelo para investigar os impactos das barragens e a eficácia de possíveis medidas de mitigação, medidas relativas à ictiofauna migratória em geral.

Diversos estudos buscaram demonstrar a magnitude e danos causados pela fragmentação dos rios sobre as populações de peixes. Assim, foram feitas pesquisas sobre a interrupção do movimento de migração (ANTÔNIO *et al.*, 2007); modificações ou atrasos nos cursos migratórios (LARINIER, 2000); alteração nas abundâncias das espécies e nos estoques pesqueiros (AGOSTINHO *et al.*, 2018; MEURER *et al.*, 2013); impactos e proposição de medidas mitigatórias para o manejo e conservação das espécies de peixes (DE MIRANDA, 1989; JUNIOR *et al.*, 2020); e estudos relacionados às consequências do isolamento genético por fragmentação desses ecossistemas (OLIVEIRA, 2018; HILSDORF, 2020).

2.1.4 *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)

Prochilodus lineatus, é uma espécie potamódromo que ocorre naturalmente em toda a bacia do rio Grande (MELO *et al.*, 2018), a identificação destas espécies é geralmente simples, exceto em suas fases larvais, devido à presença de duas fileiras de inúmeros e diminutos dentes com formato similar a uma espátula ou foice nos lábios carnudos. Elas apresentam escamas relativamente grandes e a barbatana dorsal é acompanhada por um espinho projetado para frente, podendo este ser afilado ou bifurcado (CASTRO e VARI, 2004).

Exemplares da espécie *P. lineatus* são peixes robustos, que podem chegar até 80 cm (CASTRO e VARI, 2004). É um exemplo emblemático da história de vida de peixes potamódromos Neotropicais, onde os adultos realizam migrações para fins reprodutivos sincronizado com o início da estação chuvosa e conseqüentemente, o aumento dos níveis

das águas (CAPELETI e PETRERE JR.2006). De acordo com Lowe – Mcconnel (1999), durante este período, os machos dessas espécies emitem sons audíveis distintivos (“turros”), considerado um fator que promove o agrupamento entre eles para formar cardumes numerosos. Durante a migração os espécimes chegam a nadar centenas (até milhares) de quilômetros a montante dos rios, desde as áreas de alimentação localizadas em planícies inundadas até as áreas de desova próximas às cabeceiras. Isto potencialmente coloca juntos no mesmo local e momento indivíduos de diferentes populações (demes), ao longo de rotas migratórias comuns partilhadas. (SIVASUNDAR *et al.*, 2001; YAZEBCK e KALAPOTHAKIS, 2007).

Posteriormente à desova, os ovos e larvas descem passivamente, conduzido pela correnteza, dezenas de quilômetros rio abaixo até alcançarem áreas lânticas dos rios, local onde podem encontrar uma variedade de recursos alimentares, incluindo matéria orgânica em suspensão, algas, detritos vegetais, insetos e pequenos crustáceos. Os adultos se reproduzem vários anos consecutivos durante o seu ciclo de vida (CAROLSFELD *et al.*, 2003). Fora do período reprodutivo, o curimbatá geralmente se alimenta em áreas mais rasas e calmas dos rios (GODINHO *et al.*, 2007; MAKRAKIS, *et al.*, 2009; PENITENTE, 2018). Apresentam alta fecundidade, com desova única anual e não apresenta cuidados parentais (SIVASUNDAR *et al.*, 2001).

Prochilodus lineatus desempenha papel crucial no ecossistema aquático como parte da cadeia alimentar (CAROLSFELD *et al.*, 2003). Como espécie iliófaga (alimentando-se nos sedimentos lamacentos), o curimbatá se alimenta de uma variedade de recursos alimentares e serve como uma fonte de alimento para uma série de predadores, como aves aquáticas, e outros peixes piscívoros (PERINI, 2013). Ainda, suas larvas são usadas como fonte de alimento para espécies cultivadas em pisciculturas (PEREIRA *et al.*, 2009. Adicionalmente, a curimba também pode influenciar a estrutura e função do ecossistema por meio de suas interações tróficas e comportamentais com outras espécies, bem como através de processos como a bioturbação (*i.e.*, processo pelo qual organismos vivos reviraram, misturaram e perturbaram os sedimentos do fundo de corpos d'água ou do solo) e a ciclagem de nutrientes (CAPELETI e PETRERE JR., 2006). Nesse contexto, Flecker (1996), discute o impacto da espécie do gênero *Prochilodus* como engenheiro do ecossistema, ressaltando sua influência na diversidade e produtividade dos habitats aquáticos.

A curimba e suas espécies irmãs são consideradas dentre as espécies de peixes de água doce mais importantes na piscicultura comercial de peixes nativos, sendo

amplamente valorizada na culinária dos estados da região Nordeste do Brasil (NASCIMENTO, 2013), e também na pesca de subsistência e artesanal por populações ribeirinhas, desempenhando papel econômico e social relevante (BARBIERI *et al.*, 2004). Características como elevada taxa de crescimento, rendimento de filé de 46 a 58%, alta prolificidade (*i.e.*, refere-se à capacidade de um organismo de produzir uma grande quantidade de descendentes em um período de tempo relativamente curto) e hábito alimentar detritívoro (o que diminui os gastos de produção), tornando - a uma alternativa economicamente atrativa em sistemas de criação extensivos (PEREIRA *et al.*, 2009; CAPELETI e PETRERE JR., 2006).

2.1.5 Genética populacional de peixes de piracema

Nas últimas décadas, com o rápido surgimento de novas tecnologias, essa ciência vem revolucionando o entendimento sobre a variação genética das populações. Griffiths *et al.* (2016), conceitua genética de populações como sendo a ciência que busca estudar a distribuição e quantidade da variação genética e quais fatores podem ser responsáveis pelas suas mudanças, sendo fundamental para o entendimento de diversas indagações ecológicas e evolutivas.

Uma abordagem tradicional dos estudos genético-populacionais é a investigação da estrutura genética de populações (definida como a forma pela qual os polimorfismos genéticos estão distribuídos através do espaço, dentro e entre populações (HARTL e CLARK, 2007; HEDRICK, 2011). Estes estudos se baseiam primariamente na caracterização de dois fatores descritivos de populações e “amostras populacionais”, (*i.e.* a amostragem de vários indivíduos de uma espécie em uma mesma localidade geográfica): i) a frequências de alelos em diferentes posições do genoma (*loci* gênicos) e; ii) na frequência de genótipos.

Estes dois parâmetros principais que caracterizam geneticamente as populações permite a sumarização de um conjunto diverso de métricas e estimadores como, por exemplo, a heterozigosidade esperada, uma medida de variabilidade genética intrapopulacional de organismos sexuais, estimada através do equilíbrio de Hardy-Weinberg (relativo à associação aleatória de alelos em um *locus*); desequilíbrio de ligação (relativo à possível associação não aleatória de alelos em diferentes *loci* do genoma); índices de fixação como o F_{ST} , que mede a perda de heterozigosidade (F) genética do total (T) de uma amostra, devido a reunião dos indivíduos em diferentes “subpopulações” (S) e seus derivativos como Φ_{iST} , G_{ST} , G'_{ST} e G''_{ST} (revisados e discutidos em VERITY e

NICHOLS, 2014 e JOST *et al.*, 2018), além de métricas de distância genética, como a distância de corda de Cavalli-Sforza (KALINOWSKI, 2002) ou o D de Jost (JOST, 2008; VERITY e NICHOLS, 2014).

Desde o trabalho seminal de Smouse *et al.* (1990), cientistas e gestores têm buscado a aplicação de inferência estatística da estrutura genética, para caracterizar a presença de estoques mistos (cardumes mistos) a partir de amostras de peixes, por meio de marcadores de DNA (HALLERMAN, 2003; VALENZUELA-QUIÑONEZ, 2016). Isto é útil quando indivíduos capturados no mesmo momento e local podem pertencer a diferentes populações originais (PRITCHARD *et al.*, 2000). Este problema pode ser abordado analiticamente através de estatísticas baseadas em modelos, capazes de incorporar maior significado biológico à análise, como na inferência Bayesiana (BEAUMONT e RANNALA, 2004) e Estimativa de Máxima Verossimilhança (MLE) (WANG, 2003) de *mistura/admistura* (explicadas abaixo) e estrutura genética de populações.

Os estoques de peixes mistos podem seguir um modelo populacional geneticamente misturado, definido como um grupo onde cada indivíduo tem o seu genoma originado exclusivamente de uma única fonte populacional ancestral (*cluster* ou aglomerado genético), dentre um número K arbitrário de fontes alternativas possíveis (PRITCHARD *et al.*, 2000; WANG, 2022), em que estas não compartilham mutuamente eventos reprodutivos. Isto poderia ser hipoteticamente esperado em, digamos, uma amostra populacional de indivíduos de uma determinada espécie de salmão anádromo (que compartilha sua história de vida entre a água doce e o oceano), amostrada no mar, pouco antes de começar suas migrações para distintos rios para a reprodução. Esta amostra de genótipos de peixes teria espécimes cuja origem individual vem apenas um dos possíveis agrupamentos genéticos ancestrais, porque cada população verdadeira distinta está dentro de diferentes bacias de rios isoladas, dentro das quais parceiros realizam a reprodução.

Alternativamente, o estoque misto poderia seguir um modelo de admistura genética (*i.e.*, “miscigenação”), definido sobre a premissa de que o genoma de cada indivíduo pode possuir diferentes proporções de herança genética, a partir de mais do que apenas um deme ancestral distinto (aglomerado genético), cujas as gerações anteriores podem estar envolvidas em eventos reprodutivos comuns (PRITCHARD *et al.*, 2000; WANG, 2022). Muito escrutínio, discussão e ferramentas computacionais vieram à tona em relação à inferência da estrutura e admistura genética de populações desde a

implementação fundamental no programa STRUCTURE, de Pritchard *et al.* (2000), um dos mais amplamente aplicados neste tipo de estudo, (e.g.) Falush *et al.* (2003); Wang (2003); Evanno *et al.* (2005); Falush *et al.* (2007); Alexander *et al.* (2009); Verity e Nichols (2016); Janes *et al.* (2017); Lawson *et al.* (2018); e Wang (2022).

Este modelo de admistura parece muito adequado para espécies de peixes Neotropicais potamódromos em regiões impactadas por barragens (potencial isolamento recente) e sob influências de décadas de operações de pisciculturas e peixamentos conduzidas em grande parte sem planejamento sobre questões genéticas (potenciais estoques geneticamente diferenciados sendo introduzidos), além dos possíveis múltiplos ciclos reprodutivos individuais, ao longo de anos consecutivos, que podem levar a eventos variáveis, em relação ao momento e local final de reprodução. Todos estes fatores, em teoria, levariam a estoques de peixes de diferentes origens se reproduzindo em vários locais e momentos distintos, promovendo admistura genética de populações.

A genética populacional fomenta estratégias de conservação mais assertivas, pois fornece informações sobre a diversidade genética das espécies, que é vital para a resiliência das populações, permitindo a adaptação às mudanças ambientais e resistir às doenças (FRANKRAM *et al.*, 2008 pi 2009). A compreensão dos impactos de atividade antrópica (como barramentos) sobre as populações de peixes migratórios pode ser aprimorada com estudos genéticos. A fragmentação de habitats e alterações no fluxo dos rios podem levar à perda significativa da diversidade genética e ao isolamento populacional (WAPLES e GAGGIOTTI, 2006). Além disso, a genética pode ajudar a prever como as populações podem responder às mudanças climáticas, informando sobre medidas de adaptação e impactos sofridos (WAPLES *et al.*, 2008).

A identificação de diferentes populações e a detecção de estoques mistos são atividades essenciais para a gestão dos recursos pesqueiros, pois diferentes estoques podem ter adaptações específicas aos ambientes locais e responder de forma distinta a ambientes agressivos e antropogênicos (WAPLES e GAGGIOTTI, 2006). Além disso, a introdução de estoques criados em pisciculturas pode potencialmente introduzir (e *introgredir*) genes e combinações de genes selecionados por adaptação (*domesticação*) ao cativeiro (e.g. CHANG *et al.*, 2022; HOWE *et al.*, 2024).

O conhecimento da estrutura genética das populações é, portanto, de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de manejo e políticas de conservação, sendo fundamentais para o desenvolvimento e melhoramento de projetos para a manutenção e conservação das populações naturais de peixes e também para a prática

de repovoamento de espécies advindas de piscicultura para os reservatórios (peixamento) (YAZBECK e KALAPOTHAKIS, 2007).

Estudos populacionais que analisam a estrutura da diversidade genética em *P. lineatus* e também em outras espécies da ictiofauna dulcícola utilizando-se de diferentes marcadores moleculares como alozimas, mtDNA e microssatélites são bem documentados na literatura. Por exemplo, Sivasundar, Bermingham e Orti (2001) demonstram como as técnicas genéticas podem revelar padrões de migração e estrutura genética populacional de *P. lineatus* na bacia do alto rio Paraná.

No que diz respeito à aplicação de microssatélite em investigações mais amplas da estrutura genética populacional em *P. lineatus*, Rueda *et al.* (2013), baseando-se em 12 *loci*, revelaram evidências genéticas da presença de estoques distintos sazonalmente segregados no mesmo local no baixo rio Uruguai. Lopera-Barrero *et al.* (2019) usaram quatro *loci*, além de seis marcadores heterólogos para investigar a diversidade genética em cinco barragens nos afluentes do rio Grande, enquanto Perini *et al.* (2021) desvendaram uma dinâmica metapopulacional do tipo fonte-sumidouro envolvendo um importante afluente do baixo rio Grande, o rio Pardo (bacia do alto Paraná), aplicando cinco microssatélites específicos e mais cinco heterólogos para *P. lineatus*. Tanto Ferreira *et al.* (2017) quanto Rosa *et al.* (2022) combinaram dados de sequência de haplótipos do *D-loop* mitocondrial e sete microssatélites para análises de genética populacional, aquele estudando peixes da bacia do médio e alto Rio Paraná e este (incluindo um marcador heterólogo dentre o conjunto), avaliando a estrutura genética temporal ao longo de vários anos em um mesmo local específico do rio Mogi-Guaçu (bacia do rio Pardo). A mesma quantidade de marcadores também foi aplicada por Ferreira *et al.* (2023) para investigar a estrutura genética de *P. lineatus* da bacia do rio Paranapanema, um dos principais afluentes do alto rio Paraná, mirando rios sem barramento, ao redor do canal principal do rio (barrado)

No geral, essa literatura aponta para altos níveis de diversidade genética, baixa estrutura e diferenciação genética entre locais de coleta e estimativas de dois ou três *clusters* na amostra total (inferidos por K), raramente correlacionados diretamente a localidades geográficas específicas. Fora considerações pontuais tecidas em Yazbeck e Kalapothakis (2007), nenhum estudo de estrutura genética de populações foi ainda realizado para *P. lineatus* do alto rio Grande, a extremidade mais alta da bacia do rio da Prata.

3.OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo elucidar aspectos da estrutura da diversidade genética populacional de *Prochilodus lineatus* do alto rio Grande, MG, em uma área sob influência de barragens de usinas hidrelétricas e operações de peixamento.

3.2. Objetivos Específicos

- Aplicar novos marcadores microssatélites na determinação da estrutura da diversidade genética populacional para a espécie de *P. lineatus*;
- Analisar a diversidade genética das populações de *Prochilodus lineatus* amostradas entre as barragens das usinas hidrelétricas do Funil, Itutinga e Camargos.
- Verificar se a estruturação genética das amostras populacionais de *P. lineatus* pode ser explicada pelas localidades ou momento de coleta, a fim de *testar* a hipótese de efeito de isolamento devido a presença de barragens no alto rio Grande, sobre a diversidade genética desta espécie, um potencial modelo ambiental para peixes de piracema.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo e amostragem

A área de estudo compreende o curso superior do rio Grande, MG. Lá está localizada a UHE de Camargos (21° 19 '28" S, 44° 36' 58" W), a última barragem a montante, implantada por volta de 1960. Esta usina está localizada entre os municípios de Madre de Deus e Itutinga, MG, com altitude de 913 m, possui reservatório de área inundada de 50,46 Km² e produção energética de aproximadamente 45 MW (GALIZONI, 2021).

A UHE de Itutinga (21°17'35"S, 44°37'30"S), construída em 1955, foi a primeira usina a ser implantada e é operacionalizada pela Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG). Localiza-se no limite dos municípios de Itutinga e Nazareno, MG, com altitude de 869 m. a Usina de Itutinga delimita um represamento fechado singular e relativamente pequeno (sem afluentes). Lá, uma piscicultura ambiental funcionou ativamente durante décadas na produção e liberação de reprodutores, principalmente de *P. lineatus*, em toda a região até 2018. Possui volume do reservatório de 11,4 hm³, desses 7,23 hm³ é considerado volume útil e 4,17 hm³, volume morto. Possui capacidade de produção de 52,00 MW (GANDINI, 2012).

Em seguida, mais a jusante, fica a relativamente nova barragem da UHE (ou AHE, aproveitamento hidrelétrico) do Funil (21° 8 '36.45" S, 45° 2' 11.12" W), construída por volta do ano 2000 e a única destas barragens que possui um mecanismo de transposição de peixes (MTP), um elevador (SUZUKI *et al.*, 2011). Localiza-se entre os municípios de Lavras e Perdões, MG, com área inundável de 40,49 Km², com capacidade para armazenar 258 milhões de m³ de água, e potência de 180 MW (COELHO, 2010).

As 140 amostras para extração de DNA deste estudo foram coletadas diretamente no rio Grande, em três pontos: a jusante da represa da UHE do Funil, no ano de 2013; a montante da barragem da UHE de Itutinga, sendo está em dois momentos, 2013 e 2023; no reservatório da UHE de Camargos. Estas informações estão resumidas na Tabela 3.

Foram extraídos fragmentos de tecido de nadadeiras caudais e dorsais dos espécimes de curimba adultos, os quais foram preservados em álcool 70%. Todo o material coletado foi devidamente identificado: i) local da coleta; ii) data; iii) espécie; iv) número de identificação individual e posteriormente, depositadas no Banco de DNA do Laboratório de Recursos Genéticos, da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ, MG).

Tabela 3 – Amostras populacionais de *Prochilodus lineatus*, provenientes das redondezas das três últimas barragens a montante do alto rio Grande, MG. ID=Rótulo de identificação de indivíduos. N=Tamanho amostral.

Amostra	ID	Localização	Ano de coleta	N
Camargos	1-20	21°20'27.1"S 44°36'34.3"W	2013	20
Itutinga 1	21-60	21°17'39.9"S 44°37'24.1"W	2013	40
Itutinga 2	61-100	21°17'30.4"S 44°37'11.4"W	2023	40
Funil	101-140	21°08'39.4"S 45°02'19.1"W	2013	40
Total				140

As coletas foram realizadas diretamente com os pescadores profissionais e todos os procedimentos aqui apresentados foram conduzidos sob a orientação e licença 27/2011 do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSJ), e sob as licenças CGEN A9D0E5/AC5A784 e SISBIO 37222-2 além da licença protocolada sob o CEUA nº 6991130223 (ID 000281) e Licença SISBIO 85497-1.

4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Eletroforese

Para as análises populacionais de *Prochilodus lineatus* foram selecionados um n amostral de 140 espécimes. Sendo 20 de Camargos, 40 de Itutinga1, 40 de Itutinga 2 e 40 de Funil (ver Tabela 3). Os métodos empregados para a realização de extração de DNA, PCR dos marcadores e eletroforese dos resultados dos ensaios foram aqueles apresentados no Capítulo 1 (ver tópico 1.3.2 e 1.3.3) exceto que para análises populacionais, os géis foram carregados com ladder de 25 pb e a eletroforese foi realizada com 50V a 60V, overnight, com duração média 10 a 13 hs.

4.4. Análise da estrutura populacional de *Prochilodus lineatus*

A partir das imagens obtidas dos géis foi estimado o tamanho das bandas com o auxílio do software GelAnalyzer (LAZAR, 2010). Para a determinação dos genótipos realizou-se binagens (i.e., atribuição de classes alélicas a partir da leitura de tamanho de fragmentos de DNA) manuais, que foram feitas utilizando uma planilha dinâmica (Excel).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o desequilíbrio de ligação (DL) foram testados através dos métodos implementados no GenePop 007 (ROUSSET, 2008), com opções padrão para os parâmetros de amostragem por algoritmo Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC). Os valores de significância estatística foram ajustados por correção sequencial de Bonferroni, para controlar a taxa de falsas descobertas (FDR), que aqui implicaria em rejeitar H_0 e considerar falta de conformidade com proporções esperadas de EHW.

Estimativas de diversidade, distância e estruturação genética para as amostras populacionais foram obtidas através do GenAlex (PEAKALL e SMOUSE, 2006), incluindo heterozigosidades esperadas e observadas, número de alelos (riqueza alélica), alelos privados, índice de informação de Shannon (I), distância D de Jost, os índices de fixação F_{ST} , G_{ST} , G'_{ST} (opção Nei), G''_{ST} e análise de variância molecular (AMOVA), cada um com 999 permutações aleatórias para avaliar valores de probabilidade. Para os índices de fixação e a distância D, os erros padrão (EP) foram calculados por métodos de reamostragem (*jackknife*) sobre *loci* e os intervalos de confiança (IC) foram obtidos por *bootstrap* sobre *loci* (SMOUSE e PEAKALL, 2012). Por fim, o mesmo programa foi utilizado para realizar uma análise exploratória de coordenadas principais (PCoA), baseada em distâncias euclidianas entre indivíduos da amostra.

Os dados dos microssatélites foram ainda processados conforme as etapas analíticas implementadas no programa PopCluster (WANG, 2022). Inicialmente, foi realizado um agrupamento (*clustering*) pela técnica de *k-means*, assumindo um modelo simples de mistura genética (*sensu* PRITCHARD *et al.*, 2000), em que cada genoma individual da amostra provém exclusivamente de uma das K populações ancestrais possíveis. Os resultados (frequências alélicas) destes agrupamentos são então utilizados como ponto de partida para estimação por máxima verossimilhança (MLE) dos coeficientes q de admistura (WANG, 2003), permitindo que genomas individuais apresentem porções derivadas de diferentes populações ancestrais, refletindo o cruzamento entre indivíduos de conjuntos distintos, devido ao cruzamento entre indivíduos de agrupamentos originais alternativos.

Este método possibilita a atribuição de genótipos amostrados a um dos K clusters populacionais, baseado na maximização das diferenças genéticas entre *clusters*, assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e ausência de desequilíbrio de ligação (DL) dentro dos demes. A adoção de *priors* desiguais (probabilidades *a priori*, neste caso frequências alélicas) entre os K aglomerados populacionais, baseados nos resultados do

agrupamento *k-means* ameniza, em parte, o viés inerente à amostragem desequilibrada (*i.e.* tamanhos amostrais diferentes, das populações fontes ancestrais). Devido ao mesmo problema, o fator de balanceamento fraco incorporado no modelo foi usado, após análise de diferentes cenários de balanceamento (fraco, médio, forte e sem balanceamento), conforme as orientações de Wang (2022).

Foram analisados possíveis números K de agrupamentos populacionais variando de 1 a 14, com 100 réplicas independentes cada para análise de MLE. A escolha da melhor subestrutura amostral foi feita utilizando o estimador de taxa de mudança de 2ª ordem do valor do logaritmo natural da verossimilhança, D_{LK2} (WANG, 2022), comparável em filosofia ao popular estimador ΔK de Evanno *et al.* (2005). Também foi computado o estimador F_{STIS} de K (WANG, 2022), que se baseia na lógica da maximização do F_{ST} entre *clusters* e minimização do F_{IS} dentro dos aglomerados populacionais sugeridos. Finalmente, os valores médios, mínimos e máximos das 100 réplicas para K=1 foram diretamente confrontados com os valores para o K apontado como o melhor, pela estimativa de D_{LK2} , para descartar a possibilidade de panmixia, cuja ocorrência não é captada pelo estimador (JANES *et al.*, 2017; WANG, 2022).

Uma análise hierárquica de estrutura genética sobre os agrupamentos resolvidos no modelo de admistura foi realizada (VÄHÄ *et al.* 2007; JANES *et al.* 2017): os resultados da melhor réplica, para o melhor K estimado na análise de MLE do PopCluster (resultados de 1ª ordem) foram utilizados para reagrupar os genótipos nos *clusters* sugeridos, para que a análise fosse repetida novamente (agora com K variando de 1 a 7). Os novos *clusters* encontrados foram então reagrupados, de acordo com estes novos resultados (2ª ordem) e o processo foi repetido mais uma vez (com K variando de 1 a 4), produzindo *clusters* de 3ª ordem. Estes agrupamentos foram analisados para diversidade e estrutura genética, como as amostras populacionais originais, com auxílio do programa GenAlex.

Ainda, seguindo as orientações de Wang (2022), considerando o número limitado de marcadores, a possível amostragem desequilibrada entre as populações de origem e provável sinal baixo de estruturação genética entre demes originais, também realizamos uma análise baseada em inferência Bayesiana utilizando os métodos implementados no clássico programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000), aplicando o modelo de admistura. Para isso, assumimos diferentes *priors* para cada população, onde o parâmetro de distribuição de Dirichlet (α) para cada *cluster* populacional é diferenciado (parâmetro POPALPHAS definido como 1), sem assumir, portanto, que cada população fonte contribui igualmente para a amostra (WANG, 2017). Um total de 5×10^5 passos foram descartados

(*burn-in*), antes do cômputo de 1×10^6 passos de amostragem MCMC, com K variando de 1 a 8, com 20 repetições cada, após experimentos piloto para estreitamento de K provável e baseados nos ensaios com MLE. As estimativas do melhor valor de K para a análise STRUCTURE foram realizadas com o Kfinder (WANG, 2019) e o Structure Selector (LIU e LI, 2018). Ainda foi usado o programa Clumpak (KOPELMAN *et al.*, 2015) para gerar gráficos de agrupamentos para o melhor valor de K.

Finalmente, o pacote para R *adegenet* (JOMBART, 2008) foi empregado para a condução de uma análise discriminante de componentes principais (DAPC - JOMBART *et al.*, 2010). Esta é uma abordagem que aplica funções discriminantes sobre os resultados de uma análise exploratória de componentes principais (PCA), que agrupa amostras de acordo com base na variação total dos dados, porém de forma biologicamente informativa.

5.RESULTADOS

No total foram avaliados 140 indivíduos de *Prochilodus lineatus* utilizando 15 marcadores microssatélites polimórficos caracterizados nesta pesquisa (Capítulo 1). Todos os *loci* apresentaram polimorfismo e hiper variabilidade, com o número de *alelos* variando de 13 a 31, com uma média de 22,7 ($\pm 1,3$ erro padrão da amostra - EP). Seis amostras de DNA (quatro de Camargos, uma de Itutinga 1 e uma de Funil) não conseguiram amplificar entre cinco e dez *loci*. Essas amostras foram temporariamente removidas do conjunto de dados e um conjunto de análises subsequentes foram realizadas com e sem elas, em paralelo. Contudo, não foram observadas diferenças importantes na comparação dos resultados; portanto, essas amostras foram mantidas no estudo.

As quatro amostras populacionais (Camargos, Itutinga 1, Itutinga 2 e Funil) foram avaliadas quanto à diversidade genética e características da estrutura populacional, dentro e entre localidades, e os resultados são apresentados na Tabela 4 e mais adiante. De todos os *loci*, Camargos apresentou a menor riqueza alélica com média de 10,6 ($\pm 0,8$ EP) e Itutinga 2 teve o maior valor, 16,9 ($\pm 0,9$ EP), embora aquela também tenha tido o menor tamanho amostral (20, contra 40 para cada outra amostra populacional) e média de indivíduos genotipados com sucesso, 15,2 ($\pm 0,5$ EP), enquanto as demais amostras orbitavam em torno de ~ 33 (± 1 EP). A média de número de alelos por *loci*, sobre amostras populacionais, foi de 14,8 ($\pm 1,1$ EP).

O índice de Informação de Shannon variou de 2,1 ($\pm 0,09$ EP) a 2,5 ($\pm 0,1$ EP), na média entre *loci*, dentro de amostras populacionais, sendo que Prol05 apresentou o maior conteúdo de informação (valor de 3,14 observado no Funil). A média deste índice, sobre *loci*, sobre populações foi de 2,4 ($\pm 0,05$).

A significância do EHW ajustado para 60 testes múltiplos foi $p < 0,008$. Por esse critério, apenas seis *loci* foram considerados em EHW, dentro das amostras populacionais (Prol08 para Camargos; Prol07 para Itutinga 1; Prol07 e Prol57 para Itutinga 2; e Prol07 e Prol10 para Funil). No entanto, o marcador Prol07, encontrado em conformidade com as expectativas de Hardy-Weinberg em todas as amostras populacionais, não foi considerado em EHW entre todas as quatro amostras populacionais ($p = 0,003$). Todos os desvios foram na direção de déficit de heterozigotos.

Detalhes dos valores acima e de parâmetros de estimação da diversidade genética dentro de amostras populacionais, por *locus*, podem ser obtidos por meio da Tabela 4. Valores de heterozigosidade esperada (H_e) por *locus*, dentro de populações,

apresentaram valores entre 0,64 a 0,95, com média dos *loci*, para o conjunto total da amostra, de 0,91 ($\pm 0,015$ EP) e de 0,88 ($\pm 0,01$) para a média entre populações. Camargos apresentou média de H_e sobre *loci* de 0,85 ($\pm 0,02$); Itutinga 1 de 0,88 ($\pm 0,02$); Itutinga 2 de 0,89 ($\pm 0,01$); e Funil de 0,88 ($\pm 0,01$).

A heterozigosidade observada por *locus* variou entre 0 e 0,73 para amostra populacional de Camargos; de 0,16 a 0,95 para Itutinga 1; de 0,11 a 1 em Itutinga 2; e, finalmente de 0,15 a 1 para o Funil. Na média dos *loci* por população, Camargos registrou o valor de 0,45 ($\pm 0,05$); Itutinga 1 teve média de 0,45 ($\pm 0,05$); Itutinga 2 de 0,43 ($\pm 0,07$); e Funil de 0,45 ($\pm 0,07$).

Tabela 4 – Resultados de diversidade genética para cada marcador microssatélite nas quatro amostras populacionais de *P. lineatus*. A probabilidade para o teste de Hardy-Weinberg teve significância definida em $\alpha=0,008$. Todos os valores de p são significativos, exceto onde indicado (ns).

Amostras	Locus	NN	N _a	I	H _o	H _e	F	EHW (p)
Camargos	Prol01	17	14	2.50	0.65	0.91	0.29	0.0023
	Prol02	15	14	2.41	0.60	0.89	0.33	0.0000
	Prol03	13	13	2.47	0.31	0.91	0.66	0.0000
	Prol04	17	10	2.15	0.41	0.87	0.53	0.0000
	Prol05	14	13	2.42	0.36	0.90	0.60	0.0000
	Prol06	14	9	1.90	0.43	0.81	0.47	0.0000
	Prol07	15	10	2.08	0.73	0.85	0.14	0.0191 ^{ns}
	Prol08	13	4	1.18	0.08	0.65	0.88	0.0000
	Prol10	16	10	2.11	0.69	0.85	0.19	0.0049
	Prol11	17	12	2.30	0.35	0.88	0.60	0.0000
	Prol12	13	6	1.61	0	0.77	1	0.0000
	Prol19	12	9	2.00	0.50	0.84	0.41	0.0004
	Prol53	18	9	1.72	0.33	0.77	0.57	0.0000
	Prol54	17	15	2.55	0.41	0.91	0.55	0.0000
	Prol57	17	11	2.21	0.41	0.87	0.53	0.0000
Itutinga 1	Prol01	33	16	2.57	0.27	0.91	0.70	0.0000
	Prol02	33	18	2.64	0.55	0.92	0.41	0.0000
	Prol03	31	16	2.58	0.52	0.91	0.43	0.0000
	Prol04	36	13	2.42	0.31	0.90	0.66	0.0000
	Prol05	26	22	2.91	0.62	0.94	0.34	0.0000
	Prol06	34	11	2.18	0.21	0.87	0.76	0.0000
	Prol07	20	12	2.26	0.95	0.88	-0.08	0.0157 ^{ns}
	Prol08	38	10	2.05	0.45	0.85	0.48	0.0000
	Prol10	33	20	2.86	0.73	0.94	0.22	0.0000
	Prol11	30	16	2.46	0.57	0.89	0.37	0.0000
	Prol12	31	13	2.40	0.16	0.90	0.82	0.0000
	Prol19	30	13	2.45	0.23	0.91	0.74	0.0000
	Prol53	39	9	1.44	0.31	0.64	0.52	0.0000
	Prol54	34	20	2.73	0.38	0.92	0.59	0.0000
	Prol57	38	16	2.60	0.47	0.91	0.48	0.0000

Itutinga 2	Prol01	34	19	2.70	0.29	0.92	0.68	0.0000
	Prol02	36	18	2.60	0.56	0.91	0.39	0.0000
	Prol03	39	19	2.79	0.36	0.93	0.61	0.0000
	Prol04	33	14	2.46	0.27	0.91	0.70	0.0000
	Prol05	38	24	2.96	0.39	0.94	0.58	0.0000
	Prol06	27	14	2.37	0.11	0.89	0.87	0.0000
	Prol07	27	18	2.61	0.81	0.91	0.10	0.0498 ^{ns}
	Prol08	39	14	2.32	0.62	0.87	0.30	0.0000
	Prol10	27	15	2.55	1	0.91	-0.10	0.0000
	Prol11	33	17	2.46	0.27	0.88	0.69	0.0000
	Prol12	32	17	2.62	0.34	0.91	0.62	0.0000
	Prol19	31	13	2.37	0.13	0.89	0.86	0.0000
	Prol53	40	10	1.41	0.18	0.65	0.73	0.0000
	Prol54	34	19	2.73	0.29	0.92	0.68	0.0000
	Prol57	36	22	2.78	0.81	0.92	0.13	0.0210 ^{ns}
Funil	Prol01	33	16	2.65	0.15	0.92	0.84	0.0000
	Prol02	35	17	2.54	0.49	0.91	0.46	0.0000
	Prol03	39	21	2.96	0.51	0.95	0.46	0.0000
	Prol04	39	17	2.61	0.51	0.92	0.44	0.0000
	Prol05	36	27	3.14	0.56	0.95	0.42	0.0000
	Prol06	29	12	2.00	0.21	0.79	0.74	0.0000
	Prol07	32	11	2.09	0.91	0.85	-0.07	0.4959 ^{ns}
	Prol08	32	13	2.25	0.66	0.86	0.24	0.0000
	Prol10	24	18	2.75	1	0.93	-0.08	0.7323 ^{ns}
	Prol11	30	18	2.71	0.40	0.92	0.57	0.0000
	Prol12	31	19	2.63	0.29	0.90	0.68	0.0000
	Prol19	33	15	2.56	0.15	0.91	0.83	0.0000
	Prol53	40	11	1.54	0.23	0.68	0.67	0.0000
	Prol54	25	14	2.47	0.72	0.91	0.20	0.0052
	Prol57	31	21	2.80	0.71	0.93	0.23	0.0000

N= Número de amostras; Na= Número de alelos; I= Índice de informação de Shannon; Ho= Heterozigosidade observada; He= Heterozigosidade esperada; F=Coeficiente de endogamia e EHW= Teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para testes de DL dentro de amostras populacionais, a correção sequencial de Bonferroni resultou em um nível de probabilidade de significância ajustado de $\alpha = 0,0001$, pois havia 388 pares de comparações (um total de 32 comparações entre *loci* dentro de amostras não foram realizadas, devido à taxa de falta dados). No geral, não houve desvios significativos da hipótese nula (ou seja, não foi detectado DL) entre pares de *loci* dentro da população, exceto para seis instâncias Prol06 x Prol54 em Camargos; Prol01 x Prol19, Prol05 x Prol57 em Itutinga 1; Prol01 x Prol06, Prol04 x Prol07 em Itutinga 2; e Prol53 x Prol57 em Funil. Quando examinado em toda a amostra agrupada de 140 peixes, o seguinte par de *loci* exibiu valores de p significativos para LD, indicando associação não-aleatória de alelos: Prol01 x Prol06; Prol04 x Prol07; Prol01 x Prol19; Prol06 x Prol54; Prol05 x Prol57; e Prol53 x Prol57.

O padrão de distribuição de variância molecular total entre e dentro de amostras populacionais, avaliadas através da AMOVA, está sumarizado na Tabela 5. Apenas 1% da variação total é explicada por diferentes amostras populacionais, portanto, diferentes localidades e momentos amostrados não explicam a maior parte da variação genética dos dados de microssatélites obtidos aqui.

Os diferentes índices de fixação par-a-par entre amostras populacionais estão condensados na Tabela 6. No geral, os valores mais baixos de estruturação ocorreram entre ambas as amostras de Itutinga de 2013 e 2023, enquanto Camargos apresentou as maiores comparações pareadas. Considerando todos os 15 *loci* microssatélites, entre as quatro amostras populacionais, o F_{ST} foi de 0,03 ($\pm 0,003$ EP; 0 a 0,06 intervalo de confiança - IC). O G_{ST} foi de 0,012 ($\pm 0,003$ EP; 0 a 0,018 IC); e a estimativa padronizada de Nei para G_{ST} , o G'_{ST} foi de 0,016 ($\pm 0,004$ EP; 0 a 0,024 IC). Isoladamente, cada uma dessas estimativas sugere uma fraca presença de estrutura genética entre amostras populacionais. Já a estimativa padronizada e des enviesada de G_{ST} de Hedrick, o G''_{ST} foi 0,16 ($\pm 0,03$ SE; 0 a 0,26 IC) e sugere um valor mais considerável (cerca de 10 vezes mais) de variação genética acumulada entre as amostras. Cada uma dessas estimativas teve $p=0,001$ e, apesar de abrangerem o valor zero no intervalo de confiança, são consideradas significativas pelo processo de permuta aleatória.

A distância genética D de Jost, entre amostras populacionais, no conjunto dos *loci*, foi de 0,15 ($\pm 0,03$ EP; 0 a 0,24 IC; $p=0,001$). Os valores pareados para D de Jost são apresentados na Tabela 7 e variaram de 0,137 (entre Funil e Itutinga 1) a 0,22 (Camargos e Itutinga 2). A amostra acima da barragem de Camargos é a mais diferenciada das

demais, segundo essa métrica específica. A partir da represa de Camargos, rio acima, está o último trecho não barrado do rio Grande.

O reservatório de Itutinga, que é fechado, excetuando-se iniciativas de transposição por captura à jusante e soltura de peixes à montante, e pela presença da estação de piscicultura (potencial entrada de indivíduos distintos, por peixamento ou soltura fortuita acidental ou proposital), sofreu variação de menos de 1% segundo os índices de F_{ST} , G_{ST} , e G'_{ST} . Essa magnitude, porém, foi estimada em quase 7% segundo G''_{ST} (que procura desviesar a estimativa, padronizando-a em relação ao máximo teórico possível), muito próximo ao valor de D estimado, em uma dezena de anos de intervalo de tempo entre as duas amostragens desta localidade.

Tabela 5 – Análise de variância molecular (AMOVA) das localidades amostradas e momentos (amostras populacionais) para o *Prochilodus lineatus*. Fonte da variação percentual (%); GL=graus de liberdade; SQ=Soma dos quadrados; QM=Quadrado médio; e Var.=Variância estimada.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Var.	%
Entre amostras populacionais	3	48.19	16.06	0.08	1%
Entre indivíduos	136	1404.97	10.33	3.56	52%
Dentro de indivíduos	140	449.00	3.21	3.21	47%
Total	279	1902.17		6.85	100%

Tabela 6 – Resumo dos índices de fixação par-a-par para os valores de diversidade de microssatélites entre as amostras populacionais (abaixo da diagonal). Os valores apresentados acima da diagonal representam valores de p .

	Camargos	Itutinga 1	Itutinga 2	Funil	Camargos	Itutinga 1	Itutinga 2	Funil
	F_{ST}				G_{ST}			
Camargos	-	0.002	0.001	0.001	-	0.002	0.001	0.001
Itutinga 1	0.012	-	0.005	0.001	0.009	-	0.027	0.004
Itutinga 2	0.021	0.006	-	0.001	0.012	0.003	-	0.001
Funil	0.018	0.010	0.013	-	0.012	0.004	0.008	-
	G'_{ST}				G''_{ST}			
Camargos	-	0.002	0.001	0.001	-	0.001	0.001	0.001
Itutinga 1	0.018	-	0.027	0.004	0.171	-	0.027	0.004
Itutinga 2	0.024	0.007	-	0.001	0.241	0.072	-	0.001
Funil	0.023	0.009	0.016	-	0.221	0.095	0.180	-

Tabela 7– Distância genética D de Jost para comparações de pares de amostras populacionais de *Prochilodus lineatus* (valores abaixo da diagonal). Os valores de probabilidade (p) são apresentados acima da diagonal.

	Camargos	Itutinga 1	Itutinga 2	Funil
Camargos	-	0.001	0.001	0.001
Itutinga 1	0.156	-	0.027	0.004
Itutinga 2	0.222	0.066	-	0.001
Funil	0.203	0.087	0.167	-

Todas as localidades exibiram alelos privados. No total, foram detectados 79 alelos privados diferentes distribuídos dentro das quatro amostras populacionais, com valores de média 19,75 ($\pm 12,7$ EP), sendo 7 em Camargos, 15 em Itutinga 1, 37 em Itutinga 2 e 20 em Funil, alguns em frequências apreciáveis (por exemplo, 0,15 para o alelo 20 do Prol03 em Camargos). Na Tabela Suplementar 1 (Apêndice B) é possível observar dados referentes aos alelos privados para cada população, *locus* e suas respectivas frequências.

5.1. Inferência por estimação da máxima verossimilhança de admistura

Neste trabalho foi explorado o modelo de admistura genética de populações, para inferência de estratificação (subestrutura) nas amostras populacionais, por meio de MLE, com balanceamento fraco (Wang, 2022), Esse passo ocorre após a definição de agrupamentos obtidos pelo método de agrupamento *k-means*, com o parâmetro do número K de *clusters* originais variando de 1 a 14. A decisão sobre o melhor valor de K foi tomada com base no estimador D_{LK2} de Wang, e foi computado também essa avaliação pelo estimador que se baseia na razão entre F_{ST}/F_{IS} .

Com alta convergência de valores e agrupamentos resolvidos entre réplicas (resultados não mostrados), o melhor valor de número de *clusters* dentro da amostra de 140 peixes foi de K=2 (Figura 3), com base no estimador adotado aqui. Isso sugere a existência de dois grandes agrupamentos genéticos originais na região do alto rio Grande, MG. Descartamos a possibilidade de K=1 (panmixia na amostra total), analisando diretamente os valores das médias, mínimas e máximas do log da verossimilhança dos resultados (neste caso, média de $-6,906 \times 10^2$ para K=1, contra -6.554×10^2 para K=2, em 100 réplicas). Isso é necessário pois aquele estimador de K (como o ΔK de Evanno) não é capaz de atribuir este valor mesmo quando a amostra total é panmítica (*i.e.*, o alto rio Grande como um único grande deme, de acasalamentos aleatórios ao longo deste trecho da bacia).

A estimativa F_{STIS} aponta para $K=4$ (o menor entre 4 e 5). Os agrupamentos das melhores réplicas para $K=2$ (mostrado em seguida) ou $K=4$ (resultado não mostrado), não refletem um padrão óbvio relativo ao momento de coleta (Itutinga), da ordem linear das amostras populacionais, ou da presença de barreiras migratórias (barragens) entre as localidades amostradas. Todas as quatro amostras de populações são mistas em relação aos agrupamentos resolvidos.

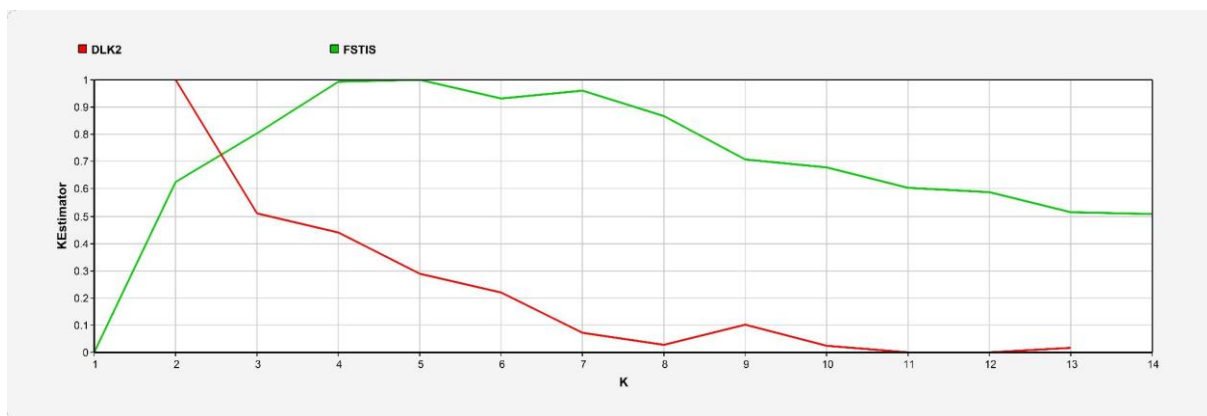


Figura 3 – Estimativas de D_{LK2} e F_{STIS} de melhor valor de número de *clusters* (K), segundo a análises de MLE em *Prochilodus lineatus* do alto rio Grande, sobre a amostra total de 140 peixes.

A melhor réplica para $K=2$, forma dois aglomerados com 70 indivíduos cada e suas identidades (ID) podem ser observadas na Figura 4 e na Tabela Suplementar 2 (Apêndice B). Apenas o indivíduo 113 (capturado no Funil) não possui admistura (*i.e.*, é de origem de uma única fonte ancestral), segundo este modelo.

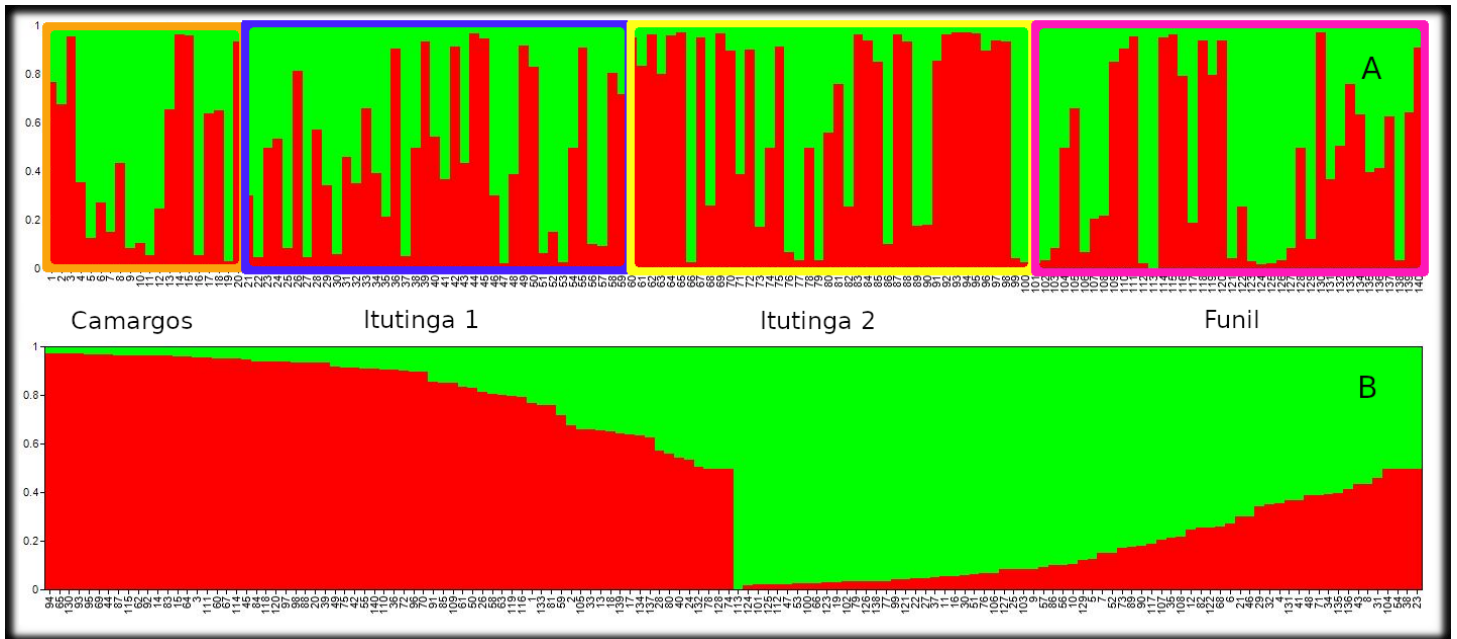


Figura 4 - Inferência de MLE de agrupamentos de indivíduos de *Prochilodus lineatus* em dois *clusters*. A) Amostras populacionais, ordenadas pelos identificadores de indivíduos (ID). B) Designação de indivíduos em cada um dos dois *clusters*, ordenados por proporções do coeficiente q de admistura individual. Esse padrão é mantido nas figuras análogas abaixo. As cores distintas nas barras verticais representam a proporção de admistura de cada indivíduo da amostra, em relação aos dois aglomerados. Os números sob barras verticais correspondem aos ID das amostras conforme Tabela Suplementar 2. Dois grandes agrupamentos de peixes geneticamente relacionados são definidos.

Cada um destes dois *clusters* de 1ª ordem foi submetido à análise hierárquica da estrutura genética por MLE, com ensaios variando de $K=1$ a 7. O melhor valor de agrupamentos encontrado foi de $K=2$, de acordo com a estimativa D_{LK2} , mostrada na Figura 5. O estimador F_{STIS} aponta para $K=5$ em um *cluster* e $K=7$ no outro. A média do log da verossimilhança de $K=1$ foi de $-3,812 \times 10^2$ contra $-3,541 \times 10^2$ para $K=2$ em um *cluster* e de $-3,747 \times 10^2$ e $-3,482 \times 10^2$, para o outro, respectivamente, e leva a refutar uma maior probabilidade de $K=1$ para cada *cluster* de 1ª ordem analisado.

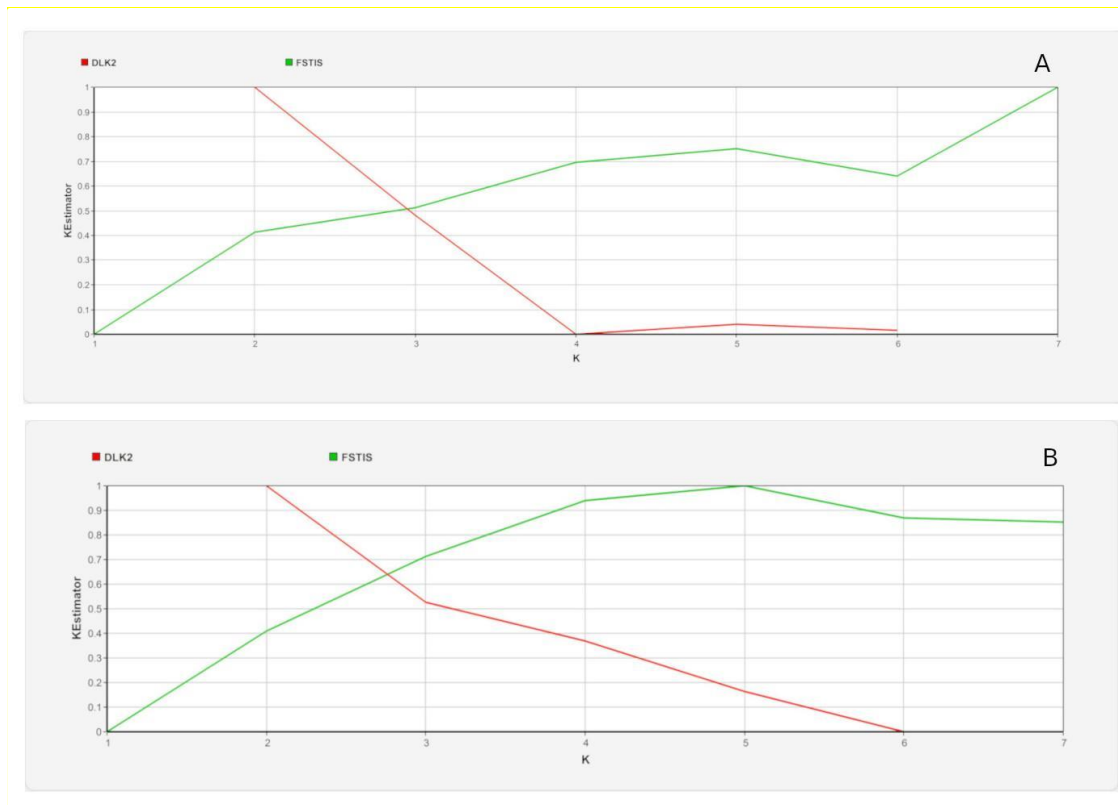


Figura 5 – Estimativas de DLK_2 e F_{STIS} de K para análise dos *clusters* de 2ª ordem. A) *Cluster* 1 de 1ª ordem. B) *Cluster* 2 de 1ª ordem.

A avaliação de subestrutura dentro de cada um dos dois *clusters* de 1ª ordem, revelou dois novos *clusters* aninhados dentro de cada agrupamento definido anteriormente, portanto, um total de 4 *clusters* de 2ª ordem, agrupados em 31, 39, 37 e 33 indivíduos da amostra completa de 140 peixes (chamado aqui de K_T , ou K em relação ao total). Estes resultados podem ser observados na Figura 6 (NB que os números abaixo de indivíduos, não mais correspondem aos rótulos de identificação ID das amostras. Para verificação das identificações corretas da designação dos indivíduos da amostra, o leitor deve se referir à Tabela Suplementar 2, no Apêndice B.

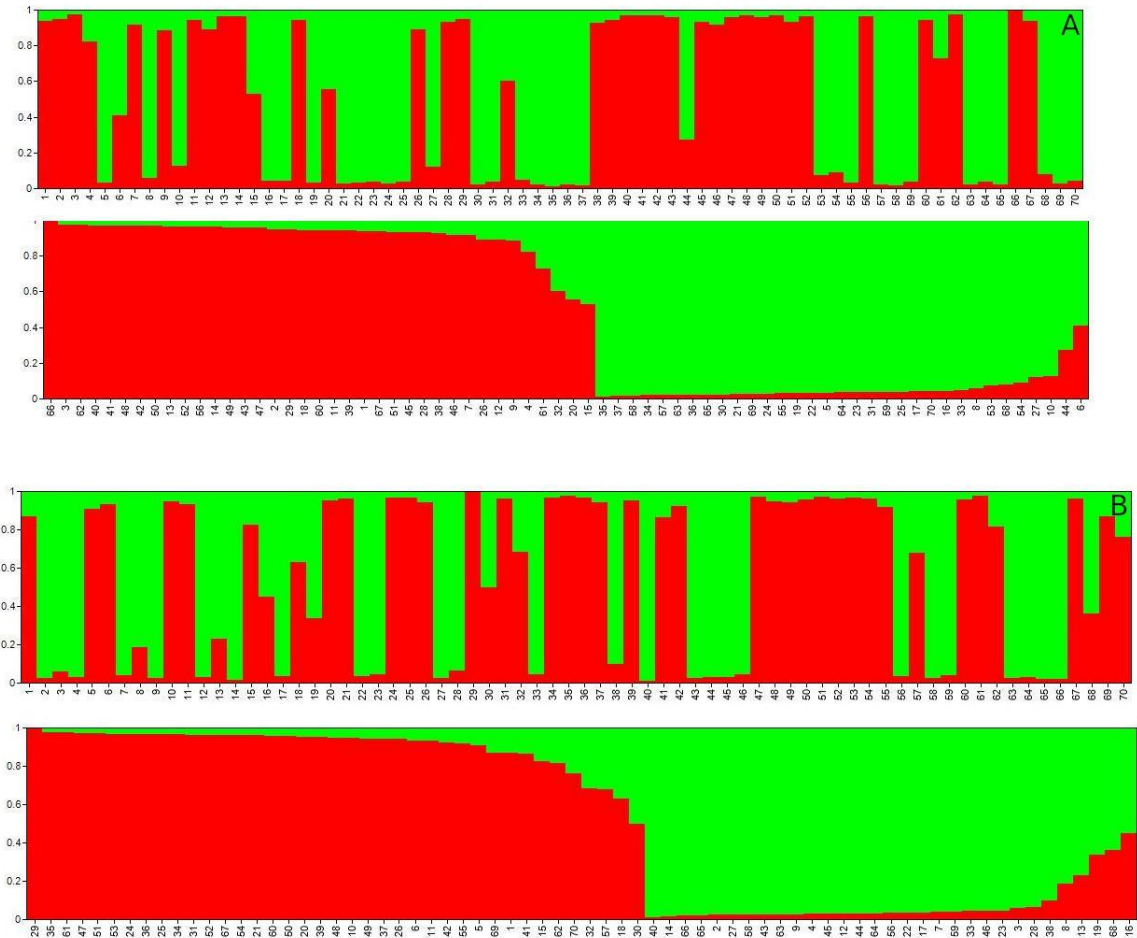


Figura 6 – Resultado da análise hierárquica de 2ª ordem. A) Decomposição do *cluster 1* de 1ª ordem. B) Decomposição do *cluster 2* de 1ª ordem. Quatro novos agrupamentos dos 140 peixes podem agora ser definidos. Os números atribuídos aos indivíduos aqui são arbitrários e não correspondem ao ID original da Tabela 2. Quatro agrupamentos geneticamente relacionados de peixes são definidos.

Iterativamente, cada um destes quatro *clusters* foi modelado mais uma vez, por MLE. Para cada um dos *clusters* analisados, o mesmo estimador de K aponta para K=2 (Figura 7), agora avaliados para K entre 1 e 4. Todas as quatro comparações de valor de log da verossimilhança entre K=1 e K=2, mostraram consistentemente um valor superior de máxima verossimilhança na hipótese de K=2, levando a refutar a possibilidade de K=1 como a mais provável (resultados omitidos). A Figura 7 registra, ainda, as estimativas de F_{STIS} que foram de K=3 para um dos quatro *clusters* analisados e de K=4, para os três restantes.

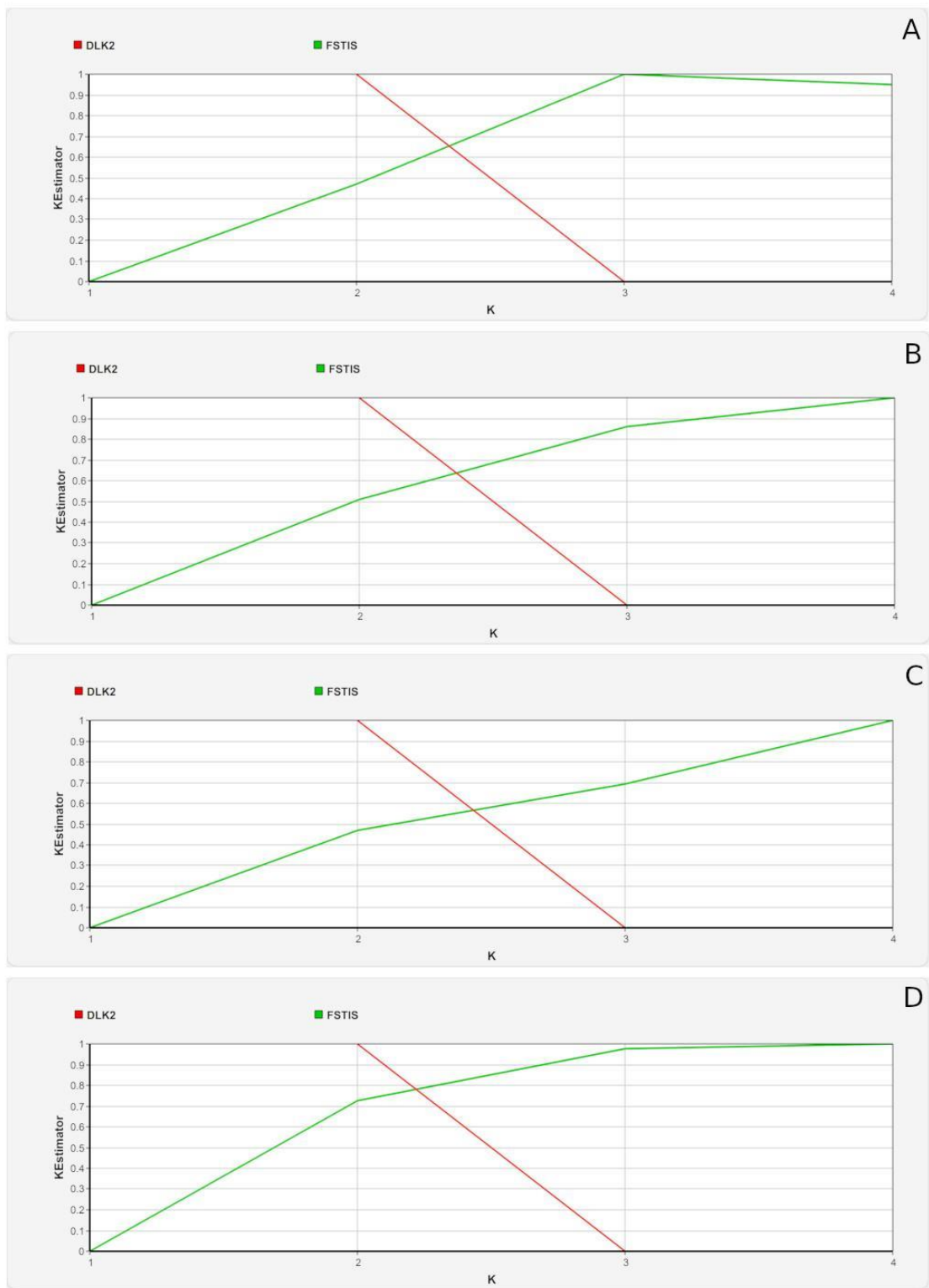


Figura 7 – Estimativas de D_{LK2} e F_{STIS} de K para análise dos *clusters* de 3ª ordem. A-D resultados para cada um dos quatro *clusters* distintos definidos na análise de 2ª ordem

A Figura 8 ilustra os resultados da melhor corrida computacional para $K=2$, guardando a mesma ressalva sobre os números arbitrários atribuídos aos indivíduos, sob as barras verticais com estimativas de admistura. Consistentemente, todas comparações de valor de log da verossimilhança entre $K=1$. Para identificação dos peixes atribuídos a cada novo *cluster* (ID da Tabela 2) é necessário verificar a Tabela Suplementar 2 do Apêndice B. De acordo com essa análise, os 140 peixes foram desdobrados em oito grupos (K_T) distintos entre si, formados por indivíduos de alta correlação genética.

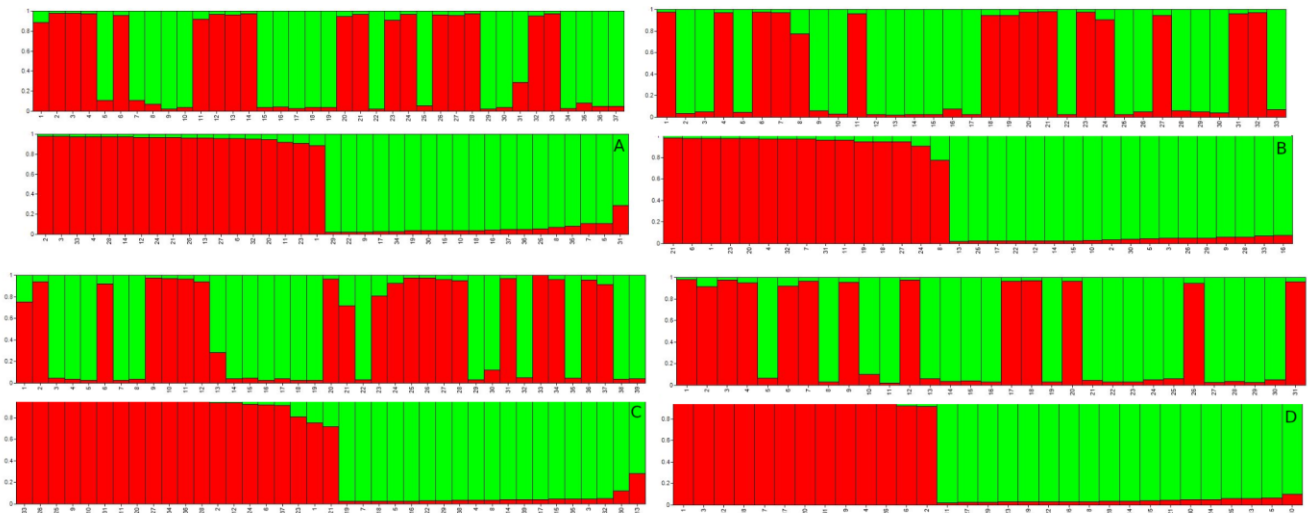


Figura 8 – Resultado da análise hierárquica de 3ª ordem. A-D representam a decomposição dos quatro *clusters* de 2ª ordem. Oito novos agrupamentos dos 140 peixes podem agora ser resolvidos. Os números dos indivíduos na figura são arbitrários e diferentes dos IDs de cada peixe da amostra. Oito agrupamentos geneticamente relacionados de peixes são definidos.

O resultado desta análise hierárquica mostra níveis aninhados de estrutura genética, revelando prováveis estoques mistos de *P. lineatus*, no alto rio Grande, compostos por indivíduos predominantemente descendentes de até oito *clusters* (K_T), ocultos em camadas mais superficiais de estrutura. Curiosamente, os resultados indicam um padrão repetitivo (autossimilar), que pode ser caracterizado como tipo-fractal, onde uma ordem superior de estrutura genética populacional da amostra (e.g. a 1ª ordem), pode ser fraturado em níveis semelhantes nas ordens inferiores de agrupamento (2ª e 3ª ordens).

As Tabelas 8 a 15 mostram os resultados médios, por populações, de indicadores da diversidade intra e interpopulacional, mostrando a coerência e sucesso da análise hierárquica em encontrar agrupamentos hierárquicos biologicamente coesos do ponto de vista genético. À medida que aprofundamos a análise em novas ordens, os agrupamentos

distintos aumentam a uniformidade intrapopulacional (e.g. queda de N_a , H_e , F) e a estruturação entre si (aumento de F_{ST} entre *clusters*, por exemplo).

Tabela 8 – Diversidade genética intrapopulacional (média sobre *loci*) para cada *cluster* definido na análise hierárquica da estrutura genética de *Prochilodus lineatus* do alto Rio Grande, MG. A 1ª ordem tem $K_T=2$, a 2ª ordem tem $K_T=4$ e a 3ª ordem tem $K_T=8$.

Agrupamentos	N	N_a	I	H_o	H_e	F
MLE						
$K_T=2$	56	19	2,57	0,450	0,893	0,500
$K_T=4$	28	14	2,32	0,450	0,869	0,486
$K_T=8$	14	10	2,07	0,451	0,839	0,473

N =Tamanho amostral; N_a =Número de alelos; I =índice de informações de Shannon. H_o =Heterozigosidade observada; H_e =Heterozigosidade esperada; F =Coeficiente de endogamia.

Tabela 9 – Índices de fixação pareada para *clusters* definidos pela análise MLE de admistura de 1ª ordem ($K_T=2$), para *Prochilodus lineatus* do alto rio Grande, MG.

	C1	C1	C1	C1
	F_{ST}		G_{ST}	
C1	-	0.001	-	0.001
C1	0.019	-	0.012	-
	G'_{ST}		G''_{ST}	
C1	-	0.001	-	0.001
C1	0,025	-	0,255	-

Tabela 10 – Índices de fixação pareada para *clusters* definidos pela análise MLE hierárquica de admistura de 2ª ordem ($K_T=4$) para *Prochilodus lineatus* do alto rio Grande, MG.

	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
	F_{ST}				G_{ST}			
C2	-	0.001	0.001	0.001	-	0.001	0.001	0.001
C2	0.026	-	0.001	0.001	0.013	-	0.001	0.001
C2	0.029	0.031	-	0.001	0.018	0.019	-	0.001
C2	0.033	0.035	0.027	-	0.020	0.021	0.015	-
	G'_{ST}				G''_{ST}			
C2	-	0.001	0.001	0.001	-	0.001	0.001	0.001
C2	0.026	-	0.001	0.001	0.244	-	0.001	0.001
C2	0.036	0.037	-	0.001	0.344	0.339	-	0.001
C2	0.040	0.042	0.029	-	0.363	0.366	0.258	-

Tabela 11 – Índices de fixação pareada (F_{ST} e G_{ST}) para *clusters* definidos pela análise MLE hierárquica de admistura de 3ª ordem ($K_T=8$), para *Prochilodus lineatus* do alto rio Grande, MG.

	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
F_{ST}								
C3	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
C3	0.058	-	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.002
C3	0.044	0.049	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
C3	0.040	0.036	0.040	-	0.012	0.018	0.001	0.008
C3	0.046	0.045	0.042	0.033	-	0.016	0.001	0.001
C3	0.042	0.039	0.042	0.030	0.030	-	0.026	0.001
C3	0.062	0.046	0.051	0.050	0.053	0.038	-	0.001
C3	0.057	0.041	0.050	0.034	0.051	0.044	0.059	-
G_{ST}								
C3	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
C3	0.034	-	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.002
C3	0.017	0.023	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
C3	0.016	0.013	0.013	-	0.012	0.019	0.001	0.008
C3	0.023	0.022	0.017	0.010	-	0.016	0.001	0.001
C3	0.019	0.017	0.016	0.007	0.008	-	0.026	0.001
C3	0.031	0.016	0.018	0.020	0.023	0.010	-	0.001
C3	0.033	0.018	0.024	0.010	0.028	0.021	0.030	-

Tabela 12 – Resumo dos índices de fixação (G'_{ST} e G''_{ST}) pareada para valores de diversidade de microssatélites entre clusters hierárquicos de 3ª ordem ($K_T=8$) para *Prochilodus lineatus* do alto rio Grande, MG.

	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
	G'_{ST}							
C3	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
C3	0.066	-	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.002
C3	0.034	0.045	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
C3	0.031	0.025	0.025	-	0.012	0.019	0.001	0.008
C3	0.044	0.044	0.033	0.019	-	0.016	0.001	0.001
C3	0.036	0.033	0.032	0.014	0.016	-	0.026	0.001
C3	0.061	0.032	0.035	0.038	0.046	0.019	-	0.001
C3	0.064	0.036	0.046	0.021	0.055	0.042	0.058	-
	G''_{ST}							
C3	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
C3	0.550	-	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.002
C3	0.295	0.400	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
C3	0.282	0.236	0.251	-	0.012	0.019	0.001	0.006
C3	0.036	0.364	0.286	0.176	-	0.014	0.001	0.001
C3	0.033	0.304	0.318	0.148	0.145	-	0.027	0.001
C3	0.050	0.271	0.312	0.354	0.376	0.178	-	0.001
C3	0,497	0.283	0.386	0.179	0.429	0,361	0.458	-

Tabela 13 – D de Jost para comparações de pares para amostras populacionais hierárquicas (cluster de 1ª ordem) de *Prochilodus lineatus*.

	C1	C1
C1	0.000	0.001
C1	0.237	0.000

Tabela 14 – D de Jost para comparações de pares para amostras populacionais hierárquicas (cluster de 2ª ordem) de *Prochilodus lineatus*.

	C2	C2	C2	C2
C2	0.000	0.001	0.001	0.001
C2	0.224	0.000	0.001	0.001
C2	0.319	0.314	0.000	0.001
C2	0.337	0.338	0.236	0.000

Tabela 15 – D de Jost para comparações de pares para amostras populacionais hierárquicas (cluster de 3ª ordem) de *Prochilodus lineatus*.

	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
C3	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
C3	0.518	0.000	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.002
C3	0.271	0.372	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
C3	0.259	0.217	0.231	0.000	0.012	0.019	0.001	0.006
C3	0.333	0.335	0.262	0.160	0.000	0.013	0.001	0.001
C3	0.306	0.281	0.295	0.135	0.132	0.000	0.028	0.001
C3	0.469	0.247	0.286	0.328	0.346	0.161	0.000	0.001
C3	0.463	0.257	0.357	0.162	0.396	0.333	0.425	0.000

5.2. Inferência Bayesiana de admistura

Análises de designação de genótipos à agrupamentos, baseado no modelo de admistura realizadas com aplicação do *software* STRUCTURE, baseado em inferência Bayesiana, foram aplicados no total de 140 indivíduos (sem aprofundamento hierárquico, por restrições de tempo e alta demanda computacional do método). Vários estimadores alternativos para melhor K foram aplicados: Ln(DIK) de Pritchard, ΔK de Evanno e Parcimônia de Wang. Alguns estimadores concordam no resultado e indicaram que o número provável de *clusters* presentes na amostra é K=5 (Figura 9). Em contrapartida, o método proposto por Pritchard *et al.* (2000) sugere que o provável número de clusters é K=8 (Figura 11). Os valores de referência estimados para LnP(D|K), ΔK e parcimônia estão detalhados na Tabelas 16. Ainda, figuras tipo *barplot* foram gerados através do software Clumpak (Figura 10 e 12) para facilitar a visualização dos agrupamentos quando K=5 e K=8.

Tabela 16 – Estimativas de melhor K para análise com STRUCTURE, para 20 réplicas de K variando entre 1 e 8, baseado em três estimadores: Ln(DIK) de Pritchard, ΔK de Evanno e Parcimônia de Wang. Os melhores valores de K, segundo estes métodos, é realçado na tabela.

K	LnP(D K) Médio	ΔK	Parcimônia
1	-9935.985	NA	0.5000
2	-9902.055	0.85121	0.0193
3	-9766.035	0.28083	0.4114
4	-9575.565	2.62246	0.6981
5	-9278.090	19.44737	0.8613
6	-9182.440	0.32277	0.6211
7	-9080.720	0.54966	0.7043
8	-8990.740	NA	0.7985

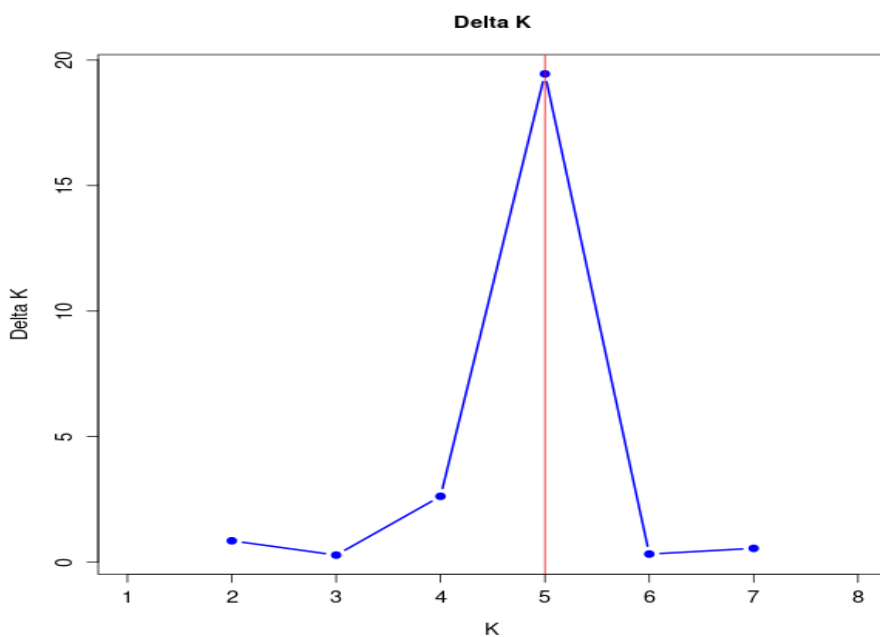


Figura 9 – Valores de ΔK estimados sobre 20 réplicas, com os dados de 15 loci, 140 indivíduos nas quatro amostras populacionais de *Prochilodus lineatus* do alto rio Grande, MG.

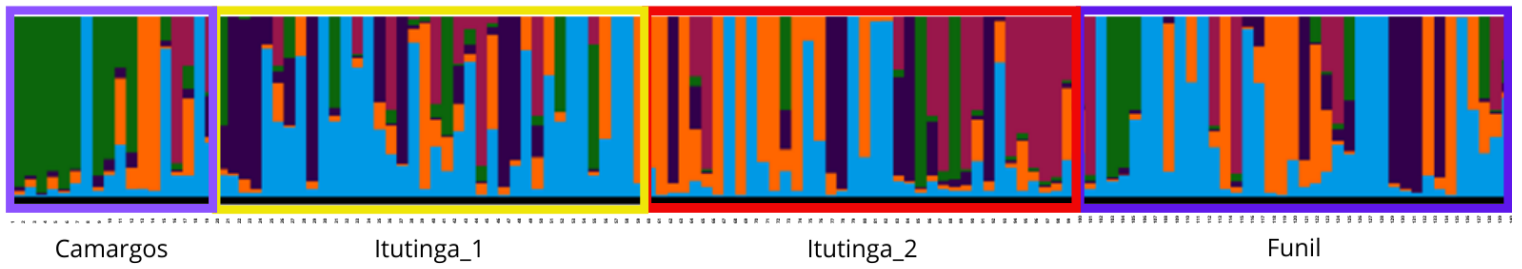


Figura 10 – Resultado da corrida de Delta K =5 de agrupamentos dos indivíduos. Amostras populacionais estão ordenadas pelos identificadores de indivíduos. Cada amostra populacional está em destaque por cores diferentes. As cores distintas nas barras verticais representam a proporção de admistura de cada indivíduo da amostra.

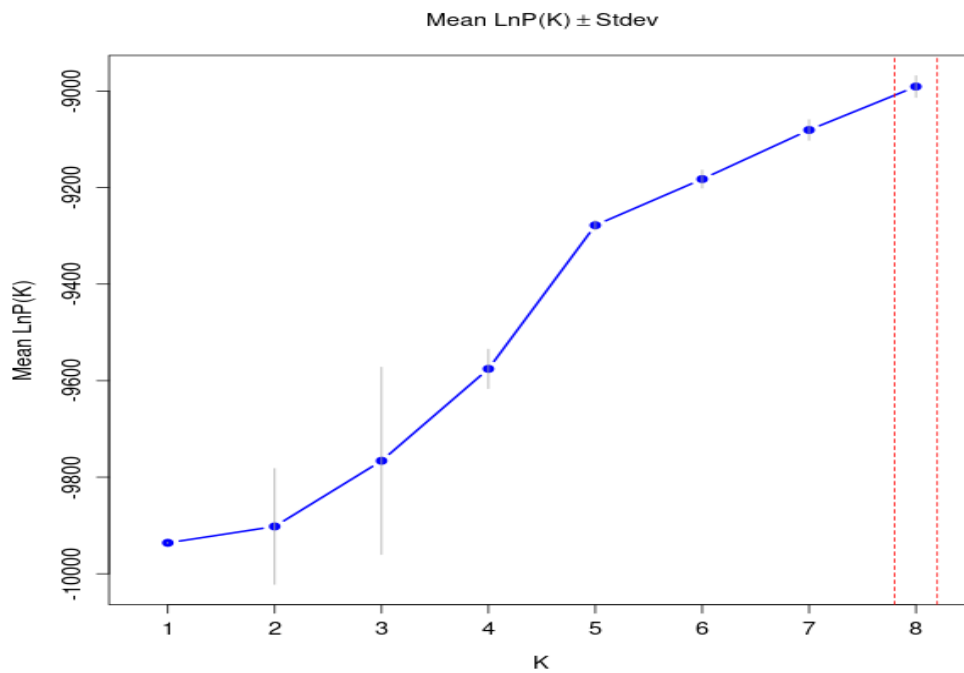


Figura 11 – Valor de LnP(K) método de Parcimônia estimado com os dados dos 15 *loci*, 140 indivíduos nas 4 populações amostradas, para K=8.

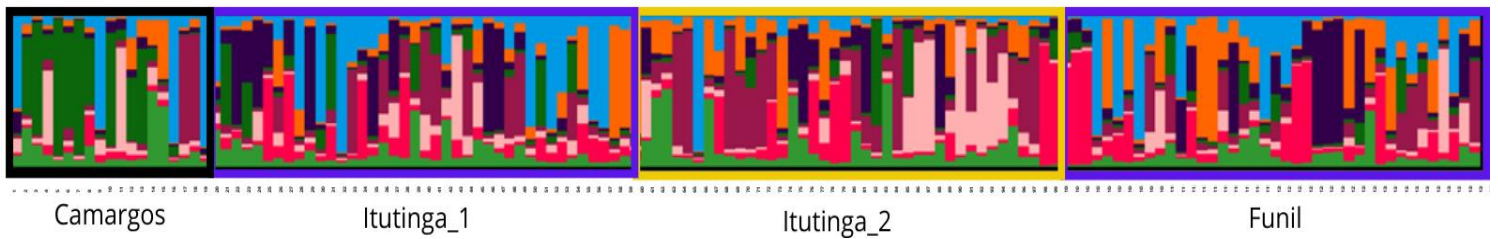


Figura 12 – Resultado da corrida do método de Parcimônia K =8 de agrupamentos dos indivíduos de *Prochilodus lineatus*. Amostras populacionais estão ordenadas pelos identificadores de indivíduos. Cada amostra populacional está em destaque por cores diferentes. As cores distintas nas barras verticais representam a proporção de admistura de cada indivíduo da amostra.

5.3. Abordagens exploratórias e análise discriminante

Uma abordagem exploratória multivariada se deu por meio de PCoA, que revela um padrão pouco estruturado dos dados, caracterizados por altos níveis difusos de variação genética. A Figura 13 mostra o resultado desta abordagem, evidenciado uma ampla dispersão dos dados, sem separação de grupos definidos no espaço ou tempo para a amostra de *P. lineatus* do alto rio Grande. Esse resultado é compatível com uma grande população panmítica ou contendo estoques mistos de subestruturação complexa.

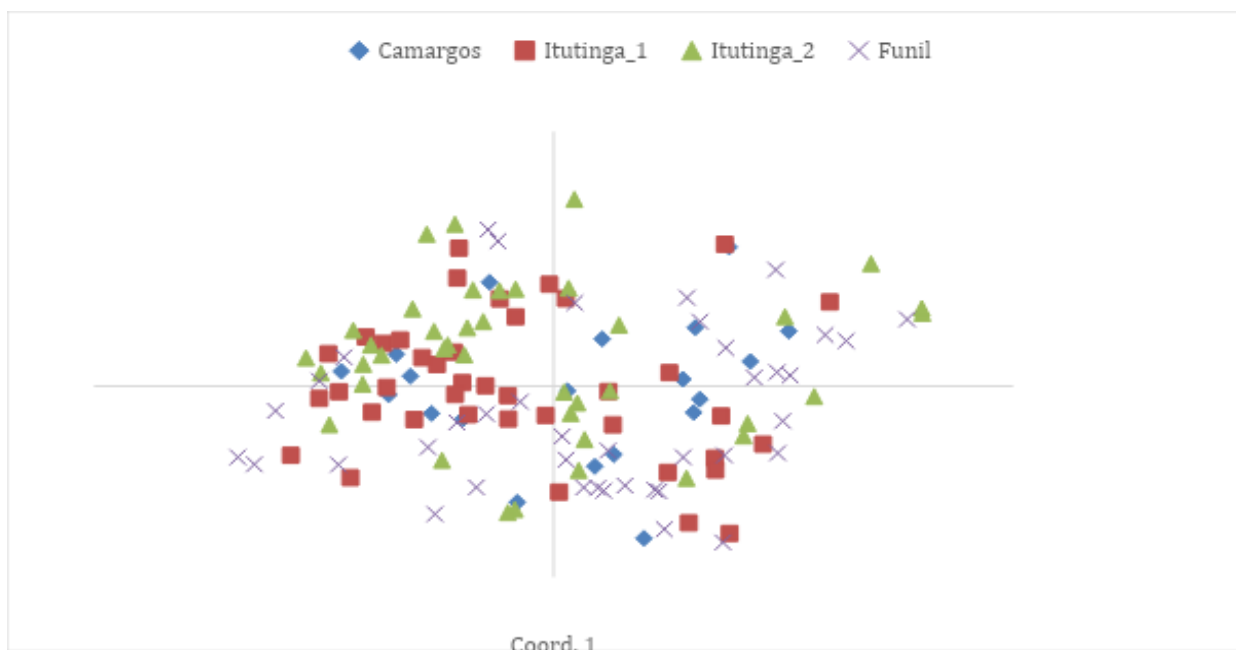


Figura 13 – Análise de coordenadas principais realizado sobre a distância euclidiana dos genótipos em 15 *loci* microssatélites (congregando 341 alelos distintos) em *Prochilodus lineatus* de três localidades do alto rio Grande, MG

Essa análise é, finalmente, complementada por uma análise discriminante de componentes principais (DAPC). Primeiro, foi feita uma análise de componentes principais (PCA) sobre a covariância do conjunto dos dados. A Figura 14 mostra a proporção de variação explicada pela retenção de componentes principais (que combinam 341 variáveis - variação nos diferentes *loci* - em novas variáveis simplificadas. Esta análise evidencia o altíssimo grau de variação individual nos dados, pelo fato da curva sugerir que a definição de um *plateau* só é alcançada com o conjunto de todos os componentes principais retidos.

Assim foram retidos 140 componentes principais para análise da busca do número de *clusters* subjacentes à amostra total. Na DAPC, essa decisão é tomada segundo o critério de informação Bayesiana (BIC - Figura 15) que indica o valor de 2 *clusters* (ponto de inflexão da curva) como sendo suficiente para capturar satisfatoriamente a variação total dos dados.

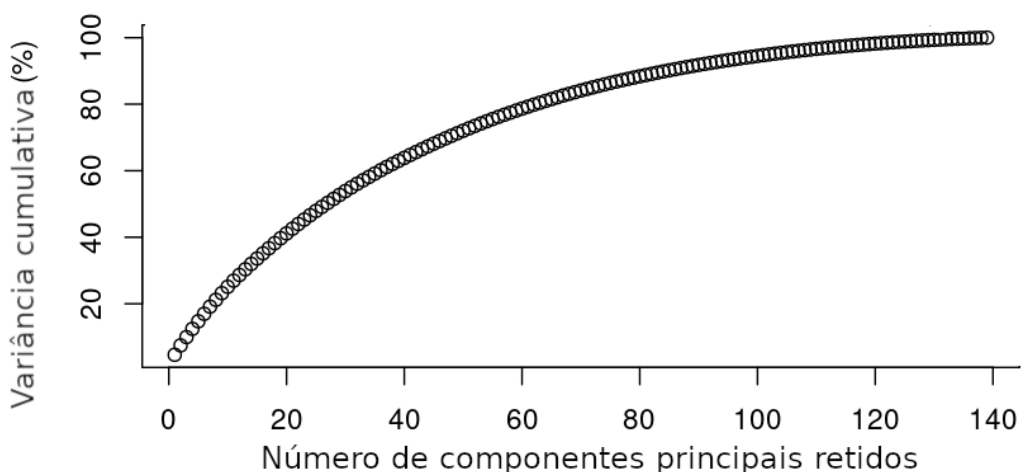


Figura 14 – Gráfico demonstrando a proporção de variação cumulativa explicada pela retenção de componentes principais.

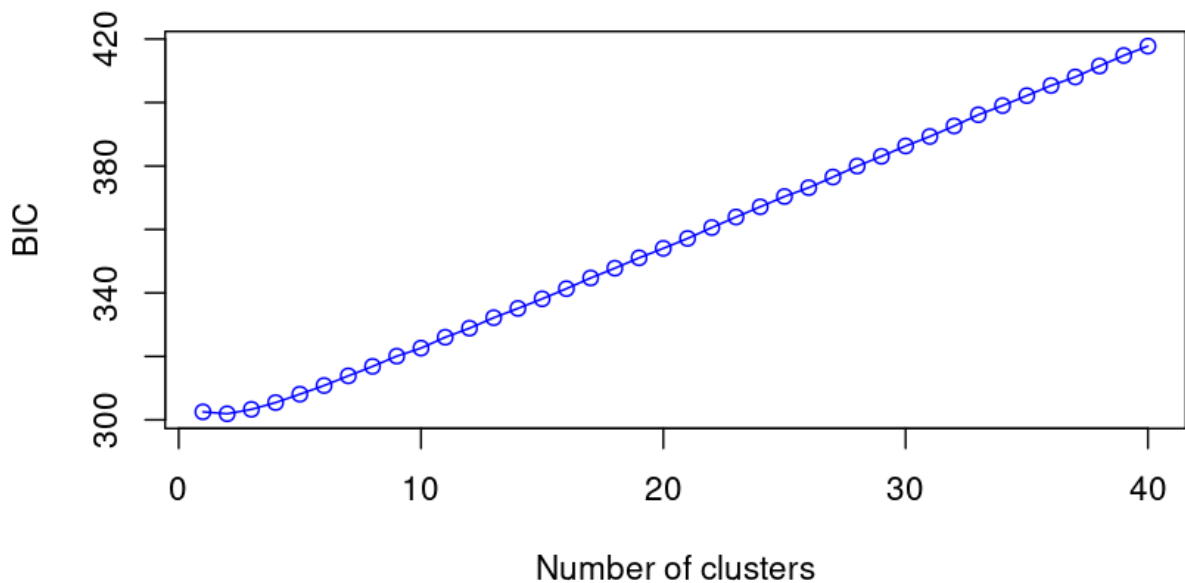


Figura 15 – Valores de BIC, critério de informação Bayesiana *versus* número de *clusters* da análise de componentes principais em *Prochilodus lineatus* do alto rio Grande, MG.

Para a DAPC foram retidos os 70 primeiros componentes principais, que explicam cerca de 80% da variação dos dados, segundo a Figura 14. Os *clusters* gerados no passo anterior são confrontados com funções discriminantes para se corroborar ou refutar a classificação anterior. Como só há dois agrupamentos, só há uma função discriminante entre eles.

Os resultados dos agrupamentos escrutinados em relação à função discriminante são apresentados na Figura 16. Esses resultados são então usados para classificar 140 indivíduos como tendo origem genética nos aglomerados 1 ou 2 (Figura 17), onde as barras representam valores de probabilidade de pertencimento a um ou outro cluster. Nesse resultado todos indivíduos são classificados nos *clusters* com alto grau de confiabilidade. Esse resultado corrobora a existência de dois grandes grupos genéticos nas amostras de *P. lineatus* no alto rio Grande, MG. As Figuras Suplementares de 5 a 8 mostra cada amostra populacional, facilitando a identificação dos indivíduos em relação à classificação DAPC. Não há concordância óbvia entre os agrupamentos encontrados e as amostras populacionais, como pode ser verificado na Figura 18. A Tabela 17 mostra quantos indivíduos, por amostra populacional, são alocados em cada um dos clusters, e o mesmo resultado pode ser graficamente observado na Figura 19, que confirma em 100% dos dados, a classificação de agrupamentos com a classificação segundo à função discriminante, indicando um padrão robusto de classificação dos peixes em dois grandes grupos genéticos distintos.

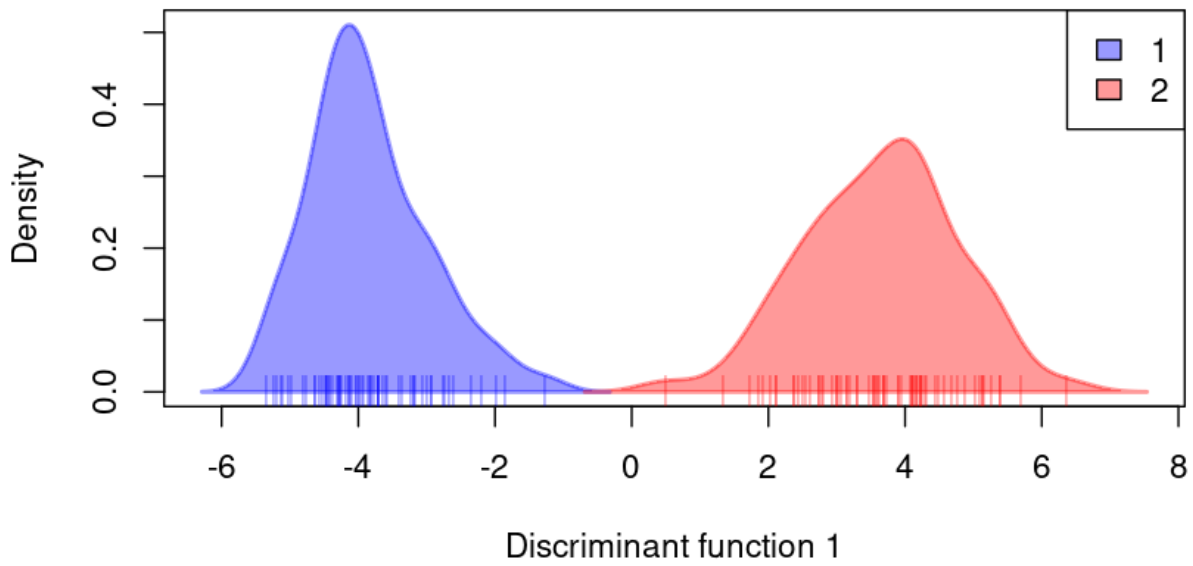


Figura 16 – Resultado da DAPC, definindo dois aglomerados principais.

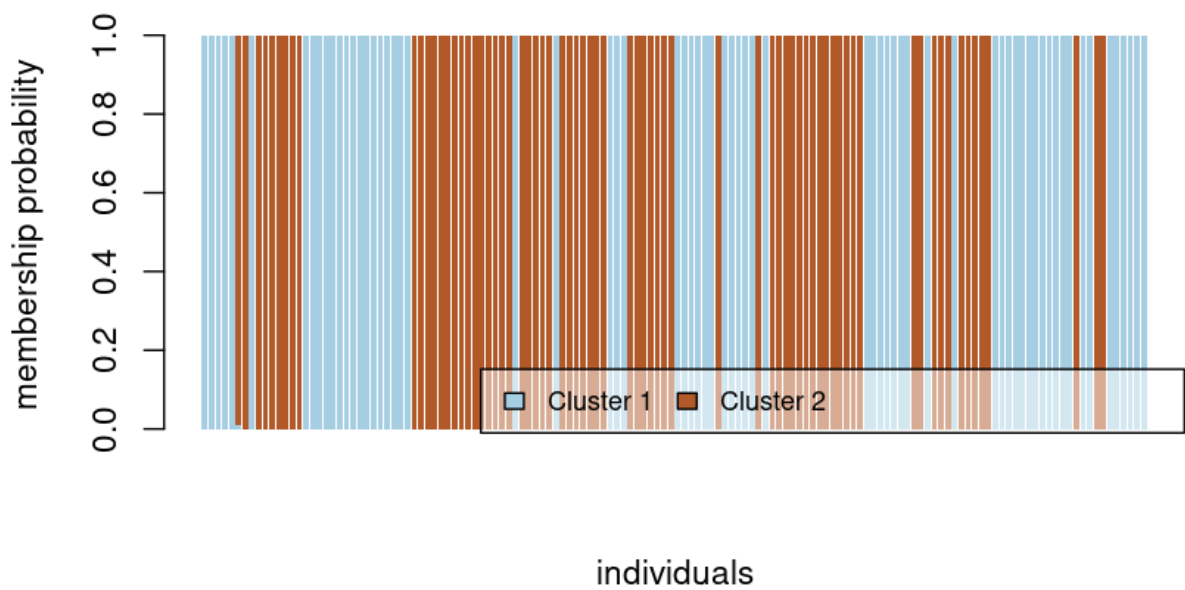


Figura 17 – Resultados da classificação DAPC dos 140 indivíduos como tendo origem genética nos aglomerados 1 ou 2.

Tabela 17 – Número de indivíduos atribuídos a cada cluster DAPC, por amostra populacional, dos 140 indivíduos de *Prochilodus lineatus*.

Amostra populacional	Cluster PCA 1	Cluster PCA 2
Camargos	11	9
Itutinga 1	13	27
Itutinga 2	17	23
Funil	27	13

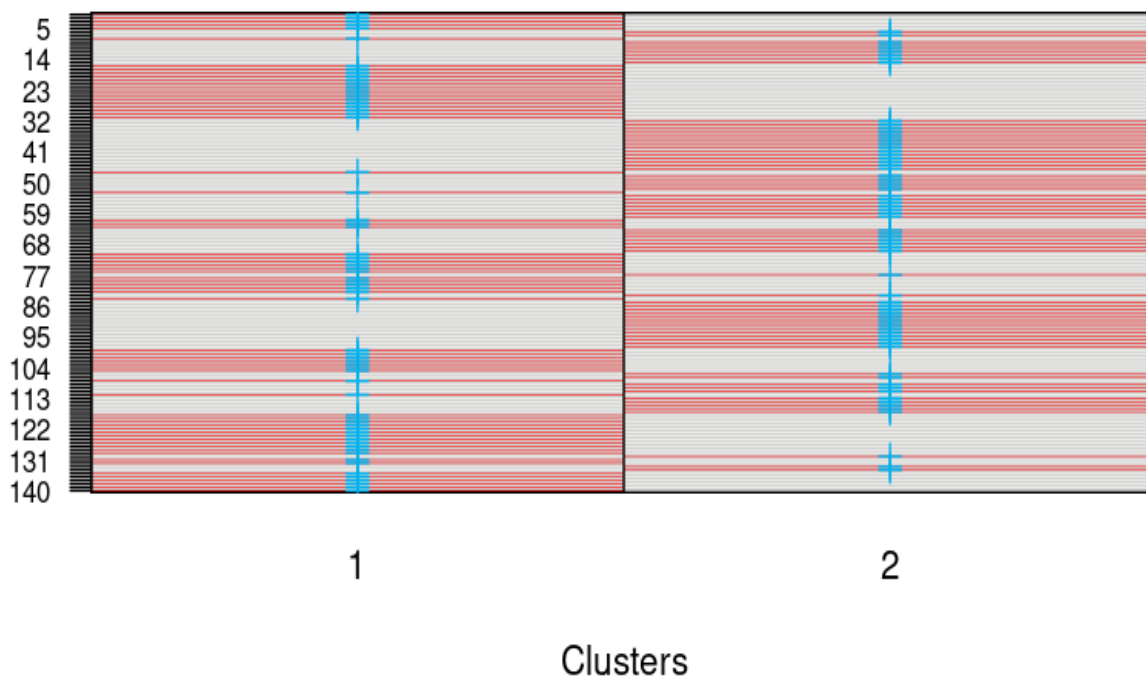


Figura 18 – Representação gráfica dos resultados Tabela 17. Em suma, as cores representam probabilidades de pertencimento (vermelho=1, branco=0); a cor azul representa o cluster inicial fornecido pelo DPAC. A classificação dos indivíduos controlados pelo DAPC é consistente com os clusters originais fornecidos.

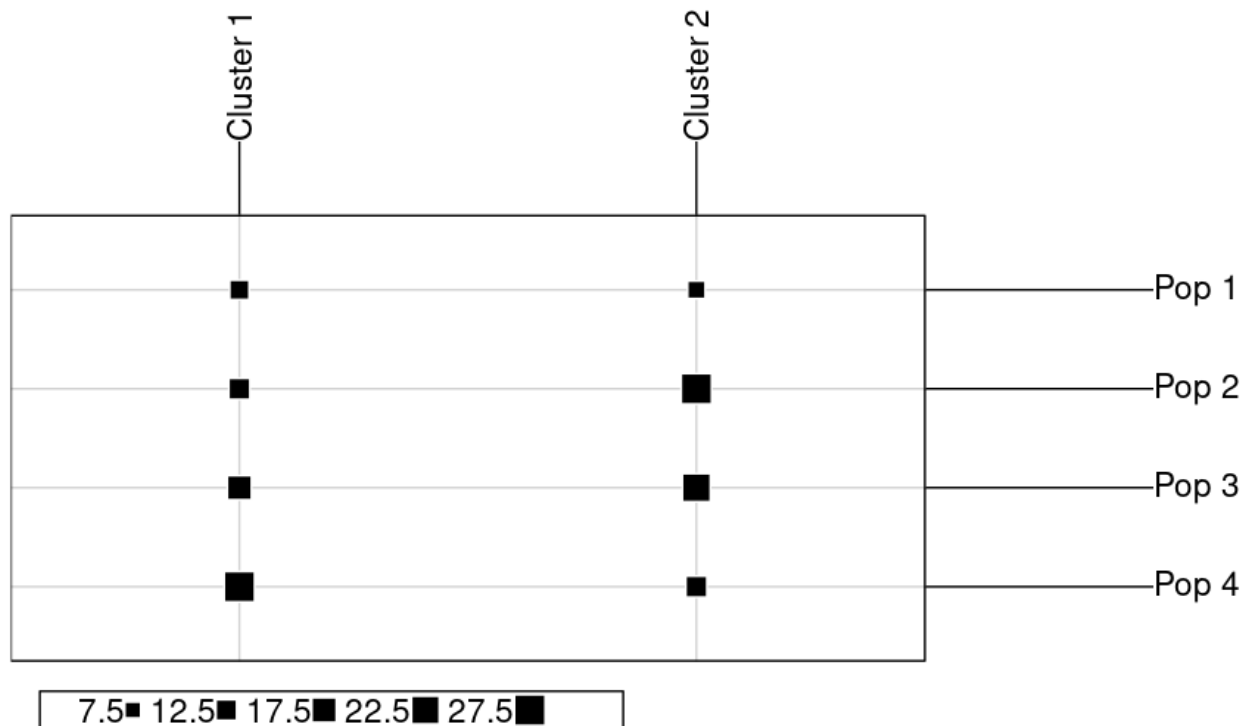


Figura 19 – Concordância entre *clusters* definidos na DAPC e amostras populacionais (Pop 1= Camargos, Pop 2= Itutinga1, Pop 3= Itutinga 2. Pop 4= Funil. O quadrado preto demonstra a proporção de indivíduos que pertencem aos *clusters* 1 e 2 dado o número total de amostragem por população.

Na próxima sessão é feita uma discussão geral dos resultados do conjunto de todas as análises apresentadas anteriormente, alguns em maior aprofundamento, procurando a interpretação de seus significados e suas implicações para os objetivos do trabalho bem como sua repercussão possível.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho explora o maior número de marcadores microssatélites (15) já empregados em uma análise de estrutura genética populacional para *P. lineatus*. Além disso, é o primeiro a fazê-lo na região do alto rio Grande, MG, um rio densamente fragmentado por barragens de UHE, na região mais alta e terminal da grande bacia do rio da Prata, a segunda maior da América do Sul, quinta maior do hemisfério ocidental, fornecendo serviços ambientais para cerca de 110 milhões de pessoas (ESPÍNDOLA *et al.*, 2021). Até então, o trabalho de RUEDA *et al.*, (2013) havia empregado 12 marcadores espécie-específicos simultaneamente, para esta espécie.

Ainda que o tamanho amostral empregado (N=140) aqui possa (deve) ser incrementado ainda mais futuramente, para capturar toda a variação genética revelada por esse tipo de marcador molecular (como sugerido na análise de PCA realizada no contexto da DAPC), consideramos o número de peixes genotipados aqui (tamanho da amostra), no geral, adequado para estimar frequências alélicas (e.g. HALE *et al.*, 2012). Os tamanhos amostrais deste estudo são comparáveis em ordem de grandeza com os demais trabalhos disponíveis neste campo para essa espécie em outras localidades (e.g. RUEDA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2015; LOPERA-BARREIRO *et al.*, 2015; PERINI *et al.*, 2020; SOUSA, 2021). Valores relacionados ao número de alelos (N_a) observados em diferentes *loci* microssatélites nas amostras estudadas aqui são razoavelmente semelhantes a outros trabalhos correlacionados (e.g. RUEDA *et al.*, 2013; PERINI *et al.*, 2021). Isso atesta para o grau de robustez dos resultados encontrados aqui, frente a literatura prévia na área.

Estes *loci* possuem intervalos de taxa de mutação altamente variáveis, incluindo valores muito mais altos que outros tipos de marcadores moleculares (ELLEGREN, 2004). Isso, em associação a tamanhos populacionais grandes, culmina em altos valores de diversidade genética para populações naturais de *Prochilodus lineatus* sistematicamente relatados previamente na literatura relevante apontada e também neste trabalho. Sob segregação populacional recente por obstáculos para a migração (UHE), é teoricamente de se esperar a redução drástica do tamanho efetivo populacional e a subsequente ação de perda de variabilidade genética dentro de locais isolados, com o passar das gerações, além da gradual diferenciação entre estes locais.

O detalhamento da análise da diversidade genética dentro e entre cada uma das quatro amostras populacionais (três localidades, sendo uma em dois momentos) mostrou um menor número de alelos observados para a localidade Camargos, que se destaca

como a última barragem em direção ao extremo superior do rio Grande, a localidade mais alta da bacia do alto rio Paraná, e que não possui um MTP. Assim, este último obstáculo potencialmente isola de forma relevante as populações à montante, na última porção do alto rio Grande, um local de boas condições de habitat natural para a ictiofauna, e área prioritária para conservação de peixes de piracema (IEF, 2021), dificultando ou impedindo o fluxo gênico e favorecendo a manifestação dos efeitos de deriva genética aleatória. Os estudos de Suzuki *et al.*, (2011) mostram uma baixa probabilidade de que larvas e juvenis transponham com facilidade a barragem passivamente em direção à jusante nesta região, então é possível que este sistema à montante esteja efetivamente isolado do restante do rio do ponto de vista ecológico e genético-populacional.

Apesar disso, operações de peixamento eram comuns na bacia (*e.g.* SARAIVA e POMPEU, 2016), até cerca de uma década atrás. Essas atividades têm o potencial para promover fluxo gênico, mas também de introduzir variação genética alóctone e com “artefatos” devido à criação de peixes em piscicultura (efeito fundador, introdução e introgressão de adaptações ao cativeiro, etc.), hipóteses largamente ainda não verificadas em peixes migratórios Neotropicais, particularmente *P. lineatus*.

No entanto, é preciso aprofundar no futuro a análise da riqueza alélica (número de alelos observados) para se afirmar mais categoricamente que este é um efeito provavelmente devido a tal isolamento, considerando o tamanho amostral menor dessa localidade, em comparação com as demais. Assumidamente, 20 indivíduos (60 alelos potencialmente amostrados em genótipos diploides), é um número limitado ou, no limiar, minimamente suficiente para descrever a variação de marcadores com média de cerca de 22 alelos por *locus* (principalmente do ponto de vista de suas frequências relativas). Com uma amostragem menor, a probabilidade de capturar todos os alelos presentes na população é menor, resultando em estimativas que não refletem com precisão o cenário real (KALINOWSKI, 2005). Possíveis direções futuras para abordar essas incertezas incluem, por exemplo, estudos de simulação computacional, estimação através de técnicas de reamostragem não-paramétrica (*e.g.* *jackknife*) destes mesmos dados (*e.g.* YAZBECK e KALAPOTHAKIS, 2007), para levar em conta o viés de tamanho amostral, além de trabalhos futuros com maior esforço de coleta.

Feitas estas ressalvas, uma análise cuidadosa de valores de fixação pelo estimador de Hedrick, G''_{ST} , que procura minimizar o viés deste tipo de abordagem, e a distância genética D de Jost, que procura incorporar aspectos relativo à diversidade de alelos entre grupos comparados, mostram sistematicamente maiores valores respectivos de variação

e distanciamento interpopulacional entre Camargos, frente às demais localidades. Inclusive há uma acentuação de sua estrutura relativa mútua quando essa amostra de 2013 é comparada à nova amostra da localidade imediatamente adjacente à jusante feita em Itutinga 10 anos. Portanto, não se pode descartar a possibilidade de que o isolamento ocasionado pela barragem da UHE de Camargos esteja levando à operação de processos microevolutivos diferenciais entre essas duas localidades vizinhas, devido à falta de comunicação para a promoção do fluxo gênico e subsequente homogeneização da diversidade genética entre peixes destes locais. Isso, se confirmado, ensejaria a consideração mais cuidadosa da presença de um MTP (visto que o habitat a montante não constituiria uma “armadilha ecológica” (PELICICE e AGOSTINHO, 2007) em Camargos e Itutinga. Isso permitiria acesso dos peixes da montante do Funil (talvez também da sua jusante, dependendo do desempenho do elevador de peixes em sua barragem) até um refúgio ecológico e a conectividade do sistema do alto rio Grande. Esse é trecho designado como área prioritária para a conservação de peixes de piracema e a evidência genética poderia ressaltar essa qualidade e pesaria contra a consideração de futura implementação de barragens rio acima.

As amostras populacionais apresentaram falta de concordância com as proporções de Hardy-Weinberg, com forte tendência à falta de heterozigotos, o que sugere subestruturação de cada amostra (ou seja, mais de um deme sendo amostrado na localidade). Esta tendência é comum para *P. lineatus* analisados com locus microsatélites (e.g. YAZBECK e KALAPOTHAKIS, 2007; RUEDA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017; PERINI *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2023) e poderia ser biologicamente entendido como uma expressão do efeito Wahlund, devido a estoques mistos de peixes geneticamente pertencentes a diversas origens, no mesmo local e amostra. Camargos apresenta os menores valores de heterozigosidade observada, o que sugere que esta população pode estar sendo mais afetada por fatores como a deriva genética e a endogamia. Em contraste, Itutinga (1 e 2) e Funil apresentaram maiores valores de H_o , o que pode ser indicativo de uma população mais heterogênea, por exemplo, devido à múltiplos eventos de introdução de peixes da piscicultura, em Itutinga e devido ao encontro de cardumes mistos tentando subir o rio e sendo acumulados no pé da barragem do Funil.

O desequilíbrio de ligação (LD) encontrado entre alguns poucos pares de *loci* pode ser resultante de mistura de subpopulações que têm frequências alélicas diferentes, resultando em associação não-aleatória de alelos em diferentes genes (SLATKIN, 2008).

A iminente obtenção de mapas físicos genéticos (genoma completo) desta espécie, permitirá a anotação destes 15 *loci* ao longo dos cromossomos e revelar se alguns pares se encontram de fato fortuita e geneticamente ligados (ou em cromossomos supranumerários, presentes na espécie - STORNIOLI *et al.*, 2021).

Três dos diferentes índices de fixação (F_{ST} , G_{ST} e G'_{ST}) mostraram valores baixos de estruturação entre pares de amostras, particularmente entre Itutinga 2013 e 2023. Em suma, os valores dos índices mostraram haver uma estruturação, ainda que baixa, porém significativa, entre as populações amostradas. Embora a variação genética entre as populações seja pequena, ela não é aleatória e há uma estrutura genética fraca, porém, detectável com o conjunto de marcadores, entre locais e momentos distintos. Os resultados de ambas as estatísticas F_{ST} e G_{ST} par-a-par concordam entre si, o que reforça a noção de baixa estruturação genética entre as amostras populacionais. Estes resultados corroboram aqueles apresentados por Rosa *et al.* (2021); Perini *et al.* (2021) em localidades mais baixas da bacia do rio Grande e do alto rio Paraná.

No entanto, a hipervariabilidade dos marcadores pode confundir uma interpretação linear da variabilidade genética de acordo com estas métricas (JOST *et al.*, 2008), e as estimativas de G''_{ST} e D apresentam valores mais expressivos que indicam uma maior importância na diversidade genética entre locais, ainda que a maior parte da variação esteja dentro destes. Os valores observados para estes dois estimadores sugerem a confirmação de que barragens estão influenciando a variação e a diferenciação genética destas três localidades.

De acordo com estas mesmas duas métricas, as amostras realizadas em dois momentos diferentes na localidade de Itutinga, um trecho peculiar do rio Grande, por ser um sistema caracteristicamente fechado e estar diretamente associado à presença de uma estação ambiental de piscicultura, sugerem a ocorrência de variação e distanciamento genético local e entre as demais localidades, no período de uma década. Houve um aumento de 7% na distância genética D de Jost e igual magnitude de variação estimada por G''_{ST} entre a amostra de peixes dentro desta mesma localidade.

Isso indica que processos genético-populacionais estão provavelmente operando nesta população de *P. lineatus*. Uma possibilidade para a diferenciação de uma população fechada seria devido à deriva genética aleatória. Porém, a maior média do número de alelos e de heterozigosidade esperada nesta localidade no segundo momento (amostra Itutinga 2) sugere um aumento da variabilidade genética ali, que poderia ser explicada pela entrada de variação genética nesta população, muito possivelmente pela introdução

sistemática de peixes da piscicultura, apesar da recente suspensão destas (operações de peixamentos ocorridos entre de 2012 a 2018). Futuramente, com desenhos amostrais adequados, incluindo amostras de origem conhecida, utilizadas em peixamentos (*baseline*) essas questões podem ser aprofundadas para um escrutínio mais assertivo e necessário para o entendimento da influência de barragens no isolamento e diversidade genética de populações de *P. lineatus*.

Os altos níveis de diversidade intrapopulacional do Funil possivelmente se justificam pelo seu barramento favorecer o acúmulo de indivíduos heterogêneos do ponto de vista genético, que ficam “aprisionados” naquele ponto, aumentando a subestruturação da amostra.

A variação total de marcadores moleculares reveladas aqui é muito tenuamente associada às localidades (e momentos) de amostragem, na ordem de apenas 1%, segundo a AMOVA, dentre as três últimas barragens sucessivas do alto rio Grande. O restante da variabilidade é explicado por diferenças genéticas entre indivíduos dentro de amostras, seguido da variação dentro de indivíduos diplóides, no conjunto dos 15 *loci*. Isso sugere que a grande maior parte da diversidade genética é mantida dentro das amostras populacionais e reflete tanto a hipervariabilidade notória dos marcadores microssatélites, o que pode ser empregado para se analisar padrões complexos de mistura/admistura genética. A análise de variância molecular mostra que, em alto grau, as localidades e momentos são relativa e mutuamente homogêneas. Isso não exclui a possibilidade da presença de um padrão de variação possivelmente complexo subjacente, o que é passível de ser analisado por meio de um maior “peneiramento” das diferenças entre indivíduos das amostras e de suas diferenças combinadas dos *loci* dentro de genomas, baseado em modelos biologicamente informativos de admistura.

As análises admistura e designação de indivíduos a populações geneticamente coesas, feitas aqui por dois métodos diferentes baseados em modelos (MLE e Bayesiana), além da análise DAPC, permitem o desenho de um seguinte cenário: há pelo menos dois grandes grupos genéticos no total da amostra, que não estão correlacionados com localidades, acima ou abaixo de barragens, ou momento das amostragens. Isso sugere a presença de estoques mistos de peixes em uma mesma “população ecológica”. Isso seria compatível com dois grupos exibindo algum grau de filopatria (*i.e.*, a tendência natural dos adultos retornarem fielmente ao sítio de origem) em relação aos sítios de reprodução (*e.g.* um grupo que tenderia a migrar para um grande tributário do rio Grande, como o rio das Mortes, MG, e outro que seguiria em direção ao alto rio Grande (*e.g.* GODINHO e

KYNARD, 2006), ou que se reproduzem no mesmo local, porém isoladamente em relação ao momento de realização da piracema (e.g. BRAGA-SILVA e GALETTI, 2015).

As estimativas de K aparentemente conflitantes entre diferentes estimadores empregados para a mesma análise (e.g. D_{LK2} vs F_{STIS} para MLE e ΔK vs $\text{LnP}(D|K)$ para análise Bayesiana) e entre análises podem ser possivelmente conciliadas através dos resultados de decomposição hierárquica da estrutura genético-populacional da amostra total. Todas apontam para K entre 2, 5, 7 ou 8 grupos, e cada uma pode estar capturando diferentes aspectos válidos de agrupamento da distribuição da variabilidade genética, que refletem eventos distintos ao longo da história passada e mais recente desta espécie (WANG, 2022), antes e depois da implementação das barragens. Segundo este autor, “estimar o valor de K é mais difícil que estimar ancestralidade ou admistura individual sob um dado K”. É possível que diferentes valores de K expliquem e descrevam a estrutura genética populacional de forma igualmente satisfatória ou muito proximamente assim (WANG, 2022) e a análise de diferentes valores de K podem revelar padrões de diferenciação em diferentes escalas evolutivas que revelam diferentes atributos das estruturas alternativas (WANG, 2022). Thibault Jombart (informalmente em seu tutorial para DAPC) discute como métodos de agrupamento (*clustering*), como *k-means* e PCA produzem agrupamentos que são simplificações ou caricaturas de realidades complexas. No caso da aplicação de MLE esse é um ponto de partida útil para fornecer frequências alélicas diferenciadas entre *clusters* para o procedimento de estimação de máxima verossimilhança. As réplicas de MLE observadas aqui (resultados não mostrados) tendem a ter alta convergência dentro dos mesmos experimentos *in silico* e até entre diferentes cenários.

Foi utilizado o método MLE para aprofundar a análise de subestrutura populacional pela quebra de *clusters* definidos pelo procedimento em novos grupos. A análise hierárquica foi capaz de produzir *clusters* de 3ª ordem ($K_T=8$) que efetivamente aumentam drasticamente a probabilidade individual de pertencimento a um determinado agrupamento e minimizam as proporções de admistura dentro de grupos (e.g. Figura 8). As análises de fixação e distância entre *clusters* e diversidade intrapopulacional destes, suporta essa noção.

Uma descoberta revelada por esta análise é particularmente interessante, pois mostra um aparente padrão tipo-fractal (no sentido da manifestação de autossimilaridade em escalas distintas da estrutura genética revelada), onde um *cluster* se desdobra em dois, e cada um em mais dois, e assim novamente. Uma analogia para se interpretar essa

abordagem é como a meticulosa remoção de camadas mais externas de uma cebola, em direção a camadas mais internas. A decomposição dos grupos, permite aos modelos empregados nestas análises de revelar com mais clareza os padrões de variação genética dentro da camada anterior. Uma possível explicação para essa observação pode ter raiz no mesmo fenômeno de filopatria levantado anteriormente, onde diferentes níveis hierárquicos de tributários de diferentes ordens, em si um possível padrão tipo-fractal de arranjo (RODRÍGUEZ-ITURBE e RINALDO, 2001), poderiam estar moldando a composição dos estoques mistos fora das áreas de reprodução. Alternativamente, uma contribuição recente dos efeitos de isolamento por barragens e de introdução de estoques dissimilares por operações de peixamento poderia estar adicionando camadas de estruturação, sobre os dois ou mais principais grupos (e.g. BERNÁS *et al.*, 2020; PIMENTEL *et al.*, 2020; KLÜTSCH *et al.*, 2021). Ainda, ambas possibilidades não são mutuamente-exclusivas.

Resta ainda uma análise aprofundada da concordância entre grupos resolvidos para os diferentes cenários de K, pelos diferentes métodos e diferentes réplicas dentro de métodos, entre MLE e inferência Bayesiana para permitir a decisão dos grupos mais relevantes dentro do contexto biológico das amostras (momento, localização, correlação entre indivíduos, etc.).

Finalmente, em resumo, os dados nos permitem inferir a existência de pelo menos dois cardumes mistos de *P. lineatus* no alto rio Grande como mais provável que uma única população panmítica (e.g. Sivasundar *et al.*, 2001), a possível subestruturação destes em padrão simétrico e hierárquico, sobre a possibilidade da existência de interrupção de fluxo gênico abaixo e acima da barragem de Camargos, da aparente diferenciação genética dentro da população de peixes ocorrendo no reservatório de Itutinga e de efeito de diferenciação entre localidades separadas por barragens, segundo critérios específicos e provavelmente mais adequados como D e G''_{ST} .

No conjunto, este trabalho fornece novas importantes informações para pesquisadores e gestores ambientais interessados no manejo e conservação de recursos hídricos e pesqueiros em áreas impactadas por barragens de UHE, no alto rio Grande, MG e apontam possíveis avenidas de investigação futura para uma melhor compreensão dos processos ecológicos e genéticos operando sobre esta importante espécie de piracema, *P. lineatus*, um peixe com vocação natural a organismo modelo de peixes potamodromos Neotropicais em áreas de intensa atividade de geração hidrelétrica e de possíveis medidas efetivas para a mitigação de seus impactos.

7 Conclusão

- Apesar da maior parte da variação genética total estar alocada dentro de localidades e momentos de amostragem, há evidências genéticas para efeito de variação e diferenciação genética entre espécimes de *Prochilodus lineatus* segregados por barragens de UHE;
- As populações acima de Camargos podem estar mais fortemente isoladas do sistema à jusante de sua barragem, mas essa noção necessita de mais informações para melhor esclarecimento e eventual confirmação;
- Itutinga parece ter aumentado em diversidade genética, o que potencialmente pode ser reflexo de atividades de peixamento na localidade;
- A alta diversidade da amostra do Funil pode ser devida ao impedimento de estoques distintos cumprirem seus cursos migratórios diversos;
- Foram identificados pelo menos dois grandes grupos genéticos distintos nos locais amostrados, que compõe estoques mistos ao longo de todas as localidades e momentos amostrados;
- Estes grupos podem ser iteradamente fracionados mais dois subgrupos revelando pelo menos oito aglomerados genéticos distintos (2x2x2), em aninhamento hierárquico tipo-fractal;
- Este padrão observado pode indicar a intrincada complexidade hidrográfica dos afluentes de diferentes ordens e sua influência nas áreas de reprodução destes peixes e/ou devido aos efeitos genéticos das atividades de piscicultura e peixamentos no alto rio Grande;
- Estes resultados irão subsidiar futuras linhas de investigação e potencialmente auxiliar gestores na conservação de recursos hídricos e os pesqueiros no alto rio Grande, MG, através do promissor modelo proporcionado por *Prochilodus lineatus*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A. *et al.*, **Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu.** 2018.

AGOSTINHO, A. A. *et al.* **Fish ladder of Lajeado Dam: migrations on one-way routes?** *Neotropical Ichthyology*, 5(2): 121-130. 2007^a.

AGOSTINHO, A. A, *et al.* **A ictiofauna de reservatórios.** Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil EDUEM, (pp. 69-97).Maringá. 2007 b.

ALCÂNTARA, A. *et al.* **Cenário da piscicultura brasileira frente à pandemia da covid-19. Pesca e aquicultura [recurso eletrônico]:** desafios na Amazônia Paraense /vários autores; organizado por Aline Marculino de Alcântara ... [*et al.*]. - **Ananindeua: Editora Itacaiúnas**, 2021.p.10.

ALEXANDER, D. H. *et al.*, . **Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals.** *Genome Research*, 19(9), 1655–1664. (2009) <https://doi.org/10.1101/gr.094052.109>

ASHIKAGA, F. Y. **Análise da Estrutura Genética de *Brycon orbignyanus* na Bacia do Rio Paraná para fins de Conservação.** 2013.

ARAKI, Hitoshi; SCHMID, Corinne. **O estoque de incubatórios é uma ajuda ou um dano?:** Evidências, limitações e direções futuras em pesquisas ecológicas e genéticas. *Aquicultura* , v. 308, P. S2-S11, 2010.

BAHRAM, S., & Inoko, H. **Microsatellite markers for genome-wide association studies.** *Nature Reviews Genetics*, 8(2), 164–164. (2007).<https://doi.org/10.1038/nrg1962-c1>

BARBIERI, G., SALLES, FA, E REZENDE, L.; **A Biologia reprodutiva do peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae) no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil.** *Revista Brasileira de Biologia* , 64(4), 881- (2004).

BARROCA, T.M. **Análise da variabilidade genética de *Prochilodus spp.* (Prochilodontidae) das bacias dos rios Paraopeba, Pará e Grande, utilizando marcador de complexas repetições hipervariáveis** [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Programa de Pós-Graduação em Genética, 2012.

BERNAŚ, R., *et al.*, **Genetic Differentiation in Hatchery and Stocked Populations of Sea Trout in the Southern Baltic: Selection Evidence at SNP Loci.** *Genes*, 11(2), 184. (2020) <https://doi.org/10.3390/genes11020184>

BOWEN, S. H. (1983). "**Detritivory in Neotropical fish communities.**" *Environmental Biology of Fishes*, 9(2), 137-144.

BRAGA-SILVA, A., GALETTI, P. M. . **Evidence of isolation by time in freshwater migratory fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae).** *Hydrobiologia*, 765(1), 159–167.(2016) <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2409-8>

BRASIL. **Lei n.º 12.488, de 9 de abril de 1997.** Torna obrigatória a construção de escadas para peixes de piracema em barragem edificada no estado de Minas Gerais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 abr. 1997.

BRAITHWAITE, V. A.; SALVANES, A. G. V. **Aquaculture and restocking: implications for conservation and welfare.** *Animal welfare*, v. 19, n. 2, p. 139-149, 2010.

BUDOWLE, B., e SAJANTILA, A. **Short tandem repeats—How microsatellites became the currency of forensic genetics.** *Nature Reviews Genetics*, 25(7), 450–451.(2024). <https://doi.org/10.1038/s41576-024-00721-1>

CALHEIROS, D.F., ARNDT, E., RODRIGUEZ E.O., SILVA, M.C.A. 2009. **Influências de Usinas Hidroelétricas no Funcionante Hidro-Ecológico do Pantanal Mato-Grossense** – Recomendações. EMBRAPA Pantanal. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC102.pdf> C

CAPELETI, A. R.; PETRERE JR. M. **Migration of the curimatá *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) at the Emas waterfall, in the Mogi-Guaçu-SP, Brazil.** *Brazilian Journal of Biology*, v. 66, p. 651-659, 2006.

CAROLSFELD, J., *et al.* **Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status.** *IDRC*.(2003)

CASSEMIRO, F. A. S. *et al.*, **Landscape dynamics and diversification of the megadiverse South American freshwater fish fauna.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(2), e2211974120. 2023. <https://doi.org/10.1073/pnas.2211974120>.

CASTRO, RMC; POLAZ, CNM . **Peixes de Pequeno Porte: A maior e mais ameaçada porção da megadiversa fauna de peixes de água doce neotropical.** *Biota Neotropica*. 20(1): E20180683. doi: 10.1590/1676-0611-Bn-2018-0683 <https://doi.org/10.1590/1676-0611-Bn-201...> 2020

CASTRO, RMC, e VARI, RP **Detritívoros da família de peixes sul-americanos Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes): um estudo filogenético e revisionário.** *Smithsonian Contributions to Zoology*, (622), 1-189.(2004).

CEMIG & CETEC. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande.** Companhia Energética de Minas Gerais e Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, Belo Horizonte, 141 p. 2000.

CESÁRIO, V. V. **Estudo sobre a ictiofauna do rio Sapucaí Mirim, afluente da margem esquerda do rio Grande no estado de São Paulo: composição, distribuição espacial e sazonalidade.** 2010.

CHAGAS, A. T. A. **Caracterização de marcadores moleculares com aplicabilidade para identificação de duas espécies de peixe com interesse forense: *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus*.** 2015.

CHANG, S. L., *et al.* **Genotyping-in-Thousands by sequencing panel development and application for high-resolution monitoring of introgressive hybridization within sockeye salmon.** *Scientific Reports*, 12(1), 3441. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07309-x>

COELHO, S. J.; PEREIRA, J. A. A. **A paisagem na área de influência da Usina Hidrelétrica do Funil (UHE-FUNIL), percebida através do EIA-RIMA.** *Paisagem e Ambiente*, n. 28, p. 133-148, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.2359-5361.v0i28p133-148>

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS (CEMIG). **Relatório Anual 2020.** Belo Horizonte: CEMIG, 2021. Disponível em: <https://www.cemig.com.br/>. Acesso em: 1 de maio de 2024.

DAGOSTA, F. *et al.* **Diversification of Neotropical freshwater fishes.** *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. v. 51, n. 1, p. 27-53, 2020.

DALIA, R. L. **Variabilidade genética e filogeografia de populações de *Prochilodus lineatus* (Pisces: prochilodontidae) das bacias dos rios Paraguai-Paraná e da bacia Amazônica: bases para programas de conservação e de piscicultura.** 2011.

DARWALL, W., *et al.*, **The Alliance for Freshwater Life: A global call to unite efforts for freshwater biodiversity science and conservation.** *Aquat Conserv.* 28: 1015-1022. doi: 10.1002/aqc.2958. 2018. <https://doi.org/10.1002/aqc.2958...>

DAVIS, C. D., *et al.*, **Refining and defining riverscape genetics**: How rivers influence population genetic structure. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 5(2), e1269. (2018) <https://doi.org/10.1002/wat2.1269>

DAVIES, JR. P. M *et al.* **Produção primária em riachos e rios tropicais**. In: Ecologia de riachos tropicais. *Imprensa Acadêmica*, 2008. p. 23-42. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50004-2>

DE LA ROSA, J. *et al.* **Caracterización genética de reproductores de *Prochilodus magdalenae* (pisces: prochilodontidae) usados en programas de repoblamiento en Colombia**. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, v. 31, n. 1, p. 53-63, 2020.

DE MIRANDA, E. *et al.* **Efeitos ecológicos das Barragens do Xingu: uma avaliação preliminar**. *Embrapa Territorial*-Capítulo em livro científico.1989.

ELLEGREN, H. . **Microsatellites: Simple sequences with complex evolution**. *Nature Reviews Genetics*, 5(6), 435–445.(2004) <https://doi.org/10.1038/nrg1348>

ESPINDOLA, I. B., *et al.* . **South-American Transboundary Waters: The Management of the Guarani Aquifer System and the La Plata Basin Towards the Future**. In R. C. Brears (Ed.), *The Palgrave Handbook of Climate Resilient Societies* (pp. 251–285). *Springer International Publishing*. 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42462-6_51

EVANNO G, *et al.* **Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study**. *Mol Ecol*. 2005 Jul;14(8):2611-20. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.

FALUSH, D., *et al.* **Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies**. *Genetics*, 164(4), 1567–1587. (2003).

FALUSH, D., *et al.*. **Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles**. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574–578. (2007). <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>

FANTIN-CRUZ, I.,*et al.* . **Changes in river water quality caused by a diversion hydropower dam bordering the Pantanal floodplain**. *Hydrobiologia*, 768, 223-230.2016.

FERREIRA, D. G., *et al.* **Different stocks of *Prochilodus lineatus* along the Cinzas River basin: Contributions from a free-flowing tributary in the Capivara Reservoir region, Paranapanema River basin (upper Paraná River)**. *Neotropical Ichthyology*, 21(4), e230080.(2023). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2023-0080>

FERREIRA, D. G., *et al.* **Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system.** *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 27(1), 209–231.(2017). <https://doi.org/10.1007/s11160-016-9441-2>

FRANKHAM, R. *et al.* **Fundamentos de Genética da Conservação.** Ribeirão Preto: *Sociedade Brasileira de Genética*, 2008, 280p.

FLECKER, A. S. **Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream.** *Ecology*, v. 77, n. 6, p. 1845-1854, 1996.

GALIZONI, T. **Previsão de vazões naturais afluentes médias semanais para usinas hidrelétricas.** 2021. 74f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hídrica) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, MG, 2021.

GANDINI, C. V. *et al.* **Estudo da alimentação dos peixes no rio Grande à jusante da usina hidrelétrica de Itutinga, Minas Gerais, Brasil.** *Iheringia. Série Zoologia*, v. 102, p. 56-61, 2012.

GRACIANO, R. C. D., *et al.* **Genomic Resources for *Salminus brasiliensis*.** *Frontiers in Genetics*, 13.(2022). <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.855718>

GODINHO, A. L., *et al.* **Migration and spawning of female curimatã-pacu, *Prochilodus argenteus*, in the São Francisco River, Brazil.** *Journal of Fish Biology*, 70(5), 1555-1573.(2007).

GODINHO, A. L., & KYNARD, B.. **Migratory fishes of Brazil: Life history and fish passage needs.** *River Research and Applications*, 22(10), 135-155. (2006)

GÓMEZ, J. A; PEREIRA, L. H. G. **Estrutura genética do pintado (*Pseudoplatystoma Corruscans*) na área de influência da barragem da Itaipu.** *Binacional*. 2017.

GRIFFITHS, A. J.F. *et al.* **Introdução à genética.** 11ª edição. Rio de Janeiro. *Guanabara Koogan*. 2016.

HALE, M. L., *et al.* (2012). **Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies.** *PLOS ONE*, 7(9), e45170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045170>

HALLERMAN, E. M. (Org.). **Population genetics: Principles and applications for fisheries scientists.** *American Fisheries Society*. (2003) <https://agris.fao.org/search/en/providers/122621/records/647396cfe01106880097fed4>

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics.** 4. ed. *Sunderland: Sinauer Associates*, 2007.

HOWE, N. S., *et al* **Genomic evidence for domestication selection in three hatchery populations of Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha***. *Evolutionary Applications*, 17(2), e13656. 2024. <https://doi.org/10.1111/eva.13656>

HILSDORF, A. W. S. **Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

IEF - **Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais**. Áreas prioritárias: Estratégias para a conservação da biodiversidade e dos ecossistemas de Minas Gerais. (2021). https://biodiversitas.org.br/wp-content/uploads/2021/10/Relatorio_Areas-Prioritarias2021_PSCRMG.pdf

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2021. **Regiões Hidrográficas do Brasil**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/analise-territorial/26395-bacia-do-rio-grande.html>. Acesso em: 01 de maio de 2024.

IWERSEN, L. H. L. *et al*. **Diversidade genética em curimba *Prochilodus lineatus* (pisces, characiformes) na bacia do alto Rio Uruguai, Brasil**. 2013.

JACOBINA, U. P. *et al*. **DNA barcode sheds light on systematics and evolution of neotropical freshwater trahiras**. *Genetica*, v. 146, p. 505-515, 2018.

JANES, J. K., *et al* **The K = 2 conundrum**. *Molecular Ecology*, 26(14), 3594–3602. 2017. <https://doi.org/10.1111/mec.14187>

JOMBART, T. **A R package for the multivariate analysis of genetic markers**. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405. 2008 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>

JOMBART, T., *et al*. **Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations**. *BMC Genetics*, 11, 94.2010 <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>

JOST, L., *et al*, **Differentiation measures for conservation genetics**. *Evolutionary Applications*, 11(7), 1139–1148. (2018).. <https://doi.org/10.1111/eva.12590>

JOST, L. **GST and its relatives do not measure differentiation**. *Molecular Ecology*, 17(18), 4015–4026. (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887>

JÚNIOR, D. V. R. *et al*. **Os impactos das barragens hidrelétricas na pesca artesanal amazônica sob o olhar dos sistemas socioecológicos**. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 11, n. 6, p. 209-223, 2020.

KALINOWSKI, S. T. **How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances?** *Heredity*, 95(6), 463-465.(2005).

KALINOWSKI, S. T. **Evolutionary and statistical properties of three genetic distances.** *Molecular Ecology*, 11(8), 1263–1273. (2002). <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01520.x>

KARDOS, M. . **Conservation genetics.** *Current Biology: CB*, 31(19), R1185–R1190. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.047>

KLÜTSCH, C. F. C., *et al.*, **Temporal analysis shows relaxed genetic erosion following improved stocking practices in a subarctic transnational brown trout population.** *Scientific Reports*, 11(1), 17396. (2021) <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96681-1>

KINGMAN, J. F. C. **On the genealogy of large populations.** *Journal of Applied Probability*, 19(A), 27–43.1982. <https://doi.org/10.2307/3213548>

KOPELMAN *et al.* (2015) **Clumpak: um programa para identificar modos de agrupamento e empacotar inferências de estrutura populacional em K.** *Molecular Ecology Resources* , 15:1179–1191. [[link](#)]

KUSMA, C. M.; FERREIRA, F. W. **Mecanismo de transposição de peixes de pequena central hidrelétrica.** *Ciência Rural*, v. 40, p. 89-94, 2010.

LAI, R., CHEN, X., ZHANG, L. 2022. **Evaluating the impacts of small cascade hydropower from a perspective of stream health that integrates eco-environmental and hydrological values.** *Journal of Environmental Management*, 305, 114366.

LARINIER, M. **Dams and fish migration.** World Commission on Dams, Toulouse, France, 2000.

LAZAR, I. **Gel Analyzer 2010a:** Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software, 2010.

LAWSON, D. *et al.*, . **A tutorial on how not to over-interpret STRUCTURE and ADMIXTURE bar plots.** *Nature Communications*, 9(1), 3258. (2018) <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05257-7>

LAYTON, K. K. S.,*et al.* . **Resolving fine-scale population structure and fishery exploitation using sequenced microsatellites in a northern fish.** *Evolutionary Applications*, 13(5), (2020). 1055–1068. <https://doi.org/10.1111/eva.12922>

LEI, Y., *et al.* . **Genome-wide characterization of microsatellite DNA in fishes: Survey and analysis of their abundance and frequency in genome-specific regions.** *BMC Genomics*, 22(1), 421. (2021). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07752-6>

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*, 18:176–177. (2018).

LOPERA-BARRERO, N. M. *et al.* **Genetic diversity of wild populations and curimba stocks for restocking programs on the Tietê, Grande, Pardo and Mogi Guaçu rivers (Brazil)**. *Bol. Inst. Fishing*, São Paulo, v. 41, no. 2, pg. 287-304, 2015.

LOPERA-BARRERO, N. M. *et al.* **Monitoring and genetic conservation of natural populations of *Prochilodus lineatus* from the Pardo, Mogi-Guaçu and Tietê rivers, São Paulo**. *Brazilian Archive of Veterinary Medicine and Animal Science*, v. 68, p. 1621-1628, 2016.

MAKRAKIS, M. C., *et al.* **Spawning of migratory fish species between dams of the upper Uruguay River, Brazil**. *Neotropical Ichthyology*, 7(2), 335-340. 2009.

MAAVARA, T., DÜRR, H.H., VAN CAPPELLEN, P. **Worldwide retention of nutrient silicon by river damming: From sparse data set to global estimate**. *Global Biogeochemical Cycles*, 28, 842-855. 2014.

MAAVARA, T., *et al.* **Global phosphorus retention by river damming**. *PNAS*, 112, 5603-15608. 2015.

MAAVARA, T., LAUERWALD, R., VAN CAPPELLEN, P. **Global perturbation of organic carbon cycling by river damming**. *Nature Communications*, 15347. 2017.

MCCONNELL, R.; LOWE-MCCONNELL, R. H. **Ecological studies in tropical fish communities**. *Cambridge University Press*, 1987.

MELO, B. F. *et al.* **Little divergence between mitochondrial lineages of *Prochilodus* (Teleostei, Characiformes)**. *Frontiers in Genetics*, vol. 9, p. 107, 2018.

MEURER, S. *et al.* **Implantation of dams on the upper Uruguay River (Brazil): influence on the assembly and biology of the main fish species**. 2013. <http://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/103309>

NASCIMENTO, A. F. **Effect of cryoprotectants, extenders and osmolality on sperm quality of *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus***. – 2013. 88f. Thesis (doctorate) – Federal University of Lavras, Lavras, MG. 2013.

NGUYEN, T. H. T., *et al.* **Modelling tools to analyze and assess the ecological impact of hydropower dams**. *Water*, 10(3), Article 3. (2018).<https://doi.org/10.3390/w10030259>

OLIVEIRA, D. J. **Identification of populations and migration patterns of *Prochilodus lineatus* in the ecosystem of the Mojiuaçu, Pardo and Grande rivers using molecular genetic markers.** UNESP Institutional Repository. 2018.

OLIVEIRA, F. A. **Procedures to improve flow regionalization: Case study of the rio Grande Basin.** 2008. 187 f. Dissertation (Master's in Agricultural Engineering) – Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

OLIVEIRA-FARIAS, K. K. C., *et al.* **Genetic structure and management of the Neotropical migratory fish *Megaleporinus obtusidens* on a highly impacted river basin.** *Hydrobiologia*, 849(7), 1645–1658. (2022).[https://doi.org/10.1007/s10750-022-04808-](https://doi.org/10.1007/s10750-022-04808-0)

OSATHANUNKUL, M., & SUWANNAPOOM, C. **Sustainable fisheries management through reliable restocking and stock enhancement evaluation with environmental DNA.** *Scientific Reports*, 13(1), 11297. (2023).
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-38218-2>

PAGLIARINI, É. C. Aplicação da análise de risco ecológico (ARE) para avaliação de impactos em ecossistemas aquáticos artificiais (reservatório de Salto Grande, Americana, SP) e naturais (Bom Repouso, MG). **Relatório Técnico nº 96.581-205.** *Ambiente & Sociedade*. São Paulo. Vol. 22, 2019.

PAIVA, M. P. *et al.* **As represas e os peixes nativos do rio Grande: bacia do Paraná, Brasil.** 2002.

PAIVA, S. **Variabilidade genética em populações de *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) do Rio Ivaí, Bacia do Alto Rio Paraná, Brasil.** 54f. 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Maringá. Paraná. 2006.

PAZ, A. R. **Previsão de afluência a reservatórios hidrelétricos – Módulo 1 – Relatório Final.** FINEP, IPH:RS; CPTEC/INPE; IAGCA/USP, 2007. 188 p.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. **GENALEX 6:** genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295. 2006.

PEAKALL, R., & SMOUSE, P. E. **GenAIEx 6.5:** Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. (2012).<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, A. A. **Fish passage facilities as ecological traps in large neotropical rivers.** *Conservation Biology: the Journal of the Society for*

Conservation Biology. 2008 Feb;22(1):180-188. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2007.00849.x. PMID: 18254863.

PENITENTE, M. **Cromossomos B: ocorrência nos peixes neotropicais e sua distribuição em *Prochilodus lineatus***. 2018. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista. Botucatu – São Paulo. 2018.

PEIXE BR, **Anuário Brasileiro da Piscicultura**. Associação Brasileira da Piscicultura. 2021. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/>. Acesso em: 23 de setembro de 2022.

PEREIRA, G. J. M. *et al.* **Indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando eCG E EBHC**. *Revista Ceres*, v. 56, n. 2, p. 156-160, 2009.

PEREIRA, LH, *et al.* **O código de barras de DNA pode discriminar com precisão a fauna de peixes de água doce neotropicais megadiversa?**. *BMC Genet* 14 , 20 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20>.

PEREIRA, L. S. *et al.* **Os mananciais de água doce apresentam fauna ictiológica mais diversa do mundo, e também estão entre os ecossistemas mais impactados devido às ações antrópicas**. *Revista Brasileira de Ecologia*, v. 25, n. 2, p. 123-135, 2020.

PIMENTEL, J. da S. M., *et al.*, **Genetic evaluation of migratory fish: Implications for conservation and stocking programs**. *Ecology and Evolution*, 10(19), 10314–10324. (2020). <https://doi.org/10.1002/ece3.6231>

PERINI, V. R. **Biologia reprodutiva e estrutura populacional de *Prochilodus lineatus* em um remanescente lótico da bacia do rio Grande**. 2013. 92 F. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – Minas Gerais. 2013.

PETRY, A. C., *et al.* **Fish assemblages of tropical floodplain lagoons: Exploring the role of connectivity in a dry year**. *Neotropical Ichthyology*, 1, 111–119. (2003). <https://doi.org/10.1590/S1679-62252003000200005>

PISTER, E. P. **Repovoamento de peixes em áreas selvagens: história e perspectiva**. *Ecosystems* , v. 4, n. 4, p. 279-286, 2001.

PIYAMONGKOI, W., *et al.* **Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: Implications for preimplantation genetic diagnosis**. *Molecular Human Reproduction*, 9(7), 411–420. (2003). <https://doi.org/10.1093/molehr/gag051>

PLANO NACIONAL DE ENERGIA (PNE). 2007. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/Plano-Nacional-de-Energia-PNE-2030>.

PORTO, A. A. C. *et al.* **Tecnologias de Proteção da Ictiofauna em Empreendimentos Hidrelétricos.** The 12th *Latin-American Congress on Electricity Generation and Transmission – Clagtee*. 2017.

PORTO, M. F. A. *et al.* **Gestão de bacias hidrográficas.** *Estudos avançados*, v. 22, p. 43-60, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142008000200004>

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. (2000). **Inference of population structure using multilocus genotype data.** *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>

REIS, R E. *et al.* **Fish biodiversity and conservation in South America.** *Journal of fish biology*, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

RESENDE, E. K. **A utopia do repovoamento.** Artigo de Divulgação na Mídia, Corumbá MS: *Embrapa Pantanal*, n. 8, abr. 2001, p.1-2.

REVALDAVES, E. **Variabilidade genética de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) na bacia do rio Paraná evidenciadas por marcadores moleculares.** 2001. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

RIBEIRO, R.P. *et al.* **Genetic diversity of pacu for restocking programs in the Tietê and Grande rivers, Brazil.** *Semin. Cienc. Agrar.*, v.35, p.3807-3826, 2015.

RIBOLLI, J. *et al.* **Genetic evidence supports a polygamous mating system in a wild population of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae), a neotropical fish that spawns in schools.** *Neotropical Ichthyology*, v. 18, 2020.

RODRIGUES, R.i R. **Sistemas de transposição de peixes: contribuições para o design e monitoramento.** 2015.

RODRÍGUEZ-ITURBE, I., & RINALDO, A. **Fractal River Basins—Chance and Self Organization.** *Cambridge University Press*. (2001). <https://www.cambridge.org/us/academic/subjects/earth-and-environmental-science/hydrology-hydrogeology-and-water-resources/fractal-river-basins-chance-and-self-organization>

ROSA, I. F. *et al.* **Temporal genetic structure of a stock of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) in the Mogi-Guaçu River ecosystem, São Paulo, Brazil.** *Neotropical Ichthyology*, v. 20, 2022.

ROUSSET, F. **Genepop'007: A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux.** *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>

RUEDA, E. C., *et al.* **Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River.** *Genetica*, 141(7–9), 401–407. 2013 <https://doi.org/10.1007/s10709-013-9739-0>

RUEDA, E. C., *et al.* **Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae).** *Conservation Genetics Resources*, 3(4), 681–684. (2011). <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9432-5>

RUZICH, J., *et al.* **Isolation by a hydroelectric dam induces minimal impacts on genetic diversity and population structure in six fish species.** *Conservation Genetics*, 20(6), 1421–1436. (2019). <https://doi.org/10.1007/s10592-019-01220-1>

SALLENAVE, R. *et al.* **Fishes in the Middle and Lower Rio Grande Irrigation Systems of New Mexico.** *College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences*, 2018.

SAMARAKOON, T., *et al.* **Enhancing PCR amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using a trehalose-based additive.** *Applications in Plant Sciences* 1 (1): 1200236, 2013.

SANTOS, R. P., *et al.* **Diversification of *Prochilodus* in the eastern Brazilian Shield: Evidence from complete mitochondrial genomes (Teleostei, Prochilodontidae).** *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 59(5), 1053–1063. 2021. <https://doi.org/10.1111/jzs.12475>

SARAIVA, S. O., e POMPEU, P. S. **Fish hatching and its effects on the morphology of *Prochilodus lineatus* (Actinopterygii: Prochilodontidae).** *Brazilian Journal of Biology*, 76(1), 209–217. (2016). <https://doi.org/10.1590/1519-6984.18514>

SCHLOTTERER, C. **The evolution of molecular markers — just a matter of fashion?** *Nature reviews genetics*, v. 5, no. 1, p. 63-69, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrg1249>

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

SHAGIN, D. A., *et al.* **A high-throughput assay for quantitative measurement of PCR errors.** *Scientific Reports*, 7(1), 2718. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02727-8>

SHEDD, K. R., *et al.* **Reduced relative fitness in hatchery-origin Pink Salmon in two streams in Prince William Sound, Alaska.** *Evolutionary Applications*, 15(3), 429–446. 2022. <https://doi.org/10.1111/eva.13356>

SLATKIN, M. **Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future.** *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 477-485. (2008). <https://doi.org/10.1038/nrg2361>

SIVASUNDAR, A. *et al.* **Population structure and biogeography of freshwater migratory fish (*Prochilodus*: Characiformes) in the main rivers of South America.** *Molecular ecology*, v. 10, no. 2, pg. 407-417, 2001.

SILVA-SENE, AM, L. *et al.*, **Distribuição da assembleia de peixes ao longo de rios de fluxo livre que entram em uma cascata de reservatório.** *Environ Biol Fish* 105 , 1535–1547 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10641-022-01345-2>

SILVA, C. F. **Pequenas centrais hidrelétricas no rio Sapucaí-mirim (sp): diversidade e estrutura genética de *Astyanax lacustris*.** 2020. 64f. Dissertação (mestrado em Zoologia) - apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP. 2020.

SOUSA, H. S. G. *et al.* **Avaliação da diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836) no Rio Claro, Goiás, Brasil.** 2021.

SOUZA, F. P. de, *et al.* **Genetic variability of *Prochilodus lineatus* in artificial and semi-natural reproduction.** *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 321–325.2017. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1365312>.

SRIVASTAVA, S., *et al.* **Patterns of microsatellite distribution across eukaryotic genomes.** *BMC Genomics*, 20(1), 153. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5516-5>

STANGE, M., *et al.* **importância da variação genômica para a biodiversidade, ecossistemas e pessoas.** *Nat Rev Genet* 22 , 89–105 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00288-7>

STORNIOLI, J. H. F., *et al* **The B Chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes) Are Highly Enriched in Satellite DNAs.** *Cells*, 10(6), 1527. 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10061527>

SUNDE, J. *et al* . **Comparing the Performance of Microsatellites and RADseq in Population Genetic Studies: Analysis of Data for Pike (*Esox lucius*) and a Synthesis of Previous Studies.** *Frontiers in Genetics*, 11. 2020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00218>

SUZUKI, FM, *et al* . **Passagem de larvas e ovos de peixes pelos reservatórios Funil, Itutinga e Camargos no alto rio Grande (Minas Gerais, Brasil).** *Neotropical Ictiologia* , 9 (3), 617–622. 2011. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252011000300014>

THALINGER, B., *et al* **Monitoring spawning migrations of potamodromous fish species via eDNA.** *Scientific Reports*, 9(1), 15388. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51398-0>

TOLMASQUIM, M. **Plano Nacional de energia 2030.** Conselho Nacional de Política Energética-CNPE, Brasília, Brazil, accessed, v. 1, n. 10, 2007.

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

VALENZUELA-QUIÑONEZ, F. **How fisheries management can benefit from genomics?** *Briefings in Functional Genomics*, 15(5), 352–357. 2016 <https://doi.org/10.1093/bfpg/elw006>

VAN CAPPELLEN, P., MAARVARA, T., 2016. **Rivers in the Anthropocene: global scale modifications of riverine nutrient fluxes by damming.** *Ecohydrology & Hydrobiology*, 16, 106-111.

Vähä, J.-P., *et al.*, **Life-history and habitat features influence the within-river genetic structure of Atlantic salmon.** *Molecular Ecology*, 16(13), 2638–2654. (2007). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03329.x>

VERITY, R., & NICHOLS, R. A. (2014). **What is genetic differentiation, and how should we measure it—GST, D, neither or both?** *Molecular Ecology*, 23(17), 4216–4225. <https://doi.org/10.1111/mec.12856>

VERITY R, NICHOLS RA. **Estimating the Number of Subpopulations (K) in Structured Populations.** *Genetics*. 2016 Aug;203(4):1827-39. doi: 10.1534/genetics.115.180992.

VIEIRA, N. C. *et al.* **A história de um povo e sua relação com a pesca: o surgimento da vila do bonifácio, comunidade costeira estuarina da amazônia, em Bragança-PA.** Pesca e aquicultura [recurso eletrônico] : desafios na Amazônia Paraense / vários autores ; organizado por Aline Marculino de Alcântara [et al.]. - *Ananindeua*: Editora Itacaiúnas, 2021.p.94.

VIGNAL, A. *et al.* **Uma revisão sobre SNP e outros tipos de marcadores moleculares e seu uso em genética animal.** *Evolução da seleção genética* , v. 34, n. 3, pág. 275-305, 2002.

WANG, J. . **Maximum-Likelihood Estimation of Admixture Proportions From Genetic Data.** *Genetics*, 164(2), 747–765. 2003. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.2.747>

WANG, H., Y, B.,*et al.* **Impact of different numbers of microsatellite markers on population genetic results using SLAF-seq data for Rhododendron species.** *Scientific Reports*, 11(1), 8597. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87945-x>

WANG, J.. **The computer program structure for assigning individuals to populations: Easy to use but easier to misuse.** *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 981–990. 2017. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12650>.

WANG, J. **Fast and accurate population admixture inference from genotype data from a few microsatellites to millions of SNPs.** *Heredity*, 129(2), 79–92. (2022).<https://doi.org/10.1038/s41437-022-00535-z>.

WANG, J. . **A parsimony estimator of the number of populations from a STRUCTURE-like analysis.** *Molecular Ecology Resources*, 19(4), 970–981. 2019. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13000>

WAPLES, R S.; GAGGIOTTI, O. REVISÃO CONVIDADA: **O que é uma população?** Uma avaliação empírica de alguns métodos genéticos para identificar o número de pools de genes e seu grau de conectividade. *Molecular ecology* , v. 15, n. 6, p. 1419-1439, 2006.

WAPLES, R S. *et al.* **Respostas evolutivas de espécies nativas a grandes mudanças antropogênicas em seus ecossistemas: salmão do Pacífico no sistema hidrelétrico do Rio Columbia.** *Molecular Ecology* , v. 17, n. 1, p. 84-96, 2008.

WILKES, M. A., *et al.* (2019). **Not just a migration problem:** Metapopulations, habitat shifts, and gene flow are also important for fishway science and management. *River Research and Applications*, 35(10), 1688–1696. <https://doi.org/10.1002/rra.3320>

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

YAZBECK, G. M., *et al.* **A broad genomic panel of microsatellite *loci* from *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Bryconidae) an endangered migratory Neotropical fish.** *Scientific Reports*, 8(1), 8511. 2018 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26623-x>

ZELLHUBER, A. **Environmental Policy in Brazil. Tensions Between Conservation and the Ideology of Growth.** In D. de la Fontaine & T. Stehnken (Eds.), *The Political System of Brazil* (pp. 329–350). *Springer*. 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40023-0_18

APÊNDICE A - FIGURAS SUPLEMENTARES



Figura 1 - Resolução eletroforética de PCR em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio, para amplificação de 20 amostras de *P. lineatus* coletado a montante da barragem de Itutinga em 2013. Marcador de peso molecular (canaleta central (L)) de 25pb.

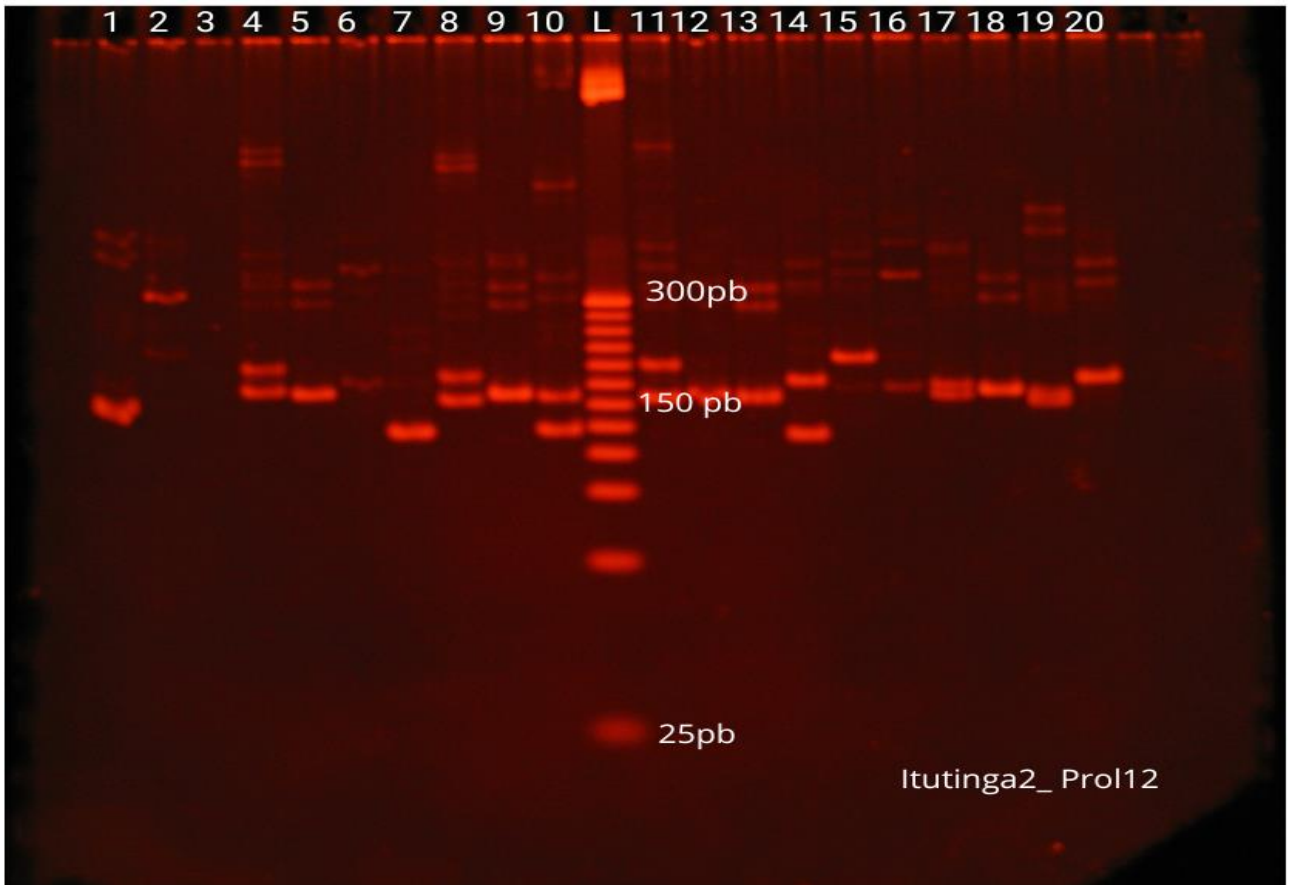


Figura 2 - Resolução eletroforética de PCR em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio, para amplificação de 20 amostras de *P. lineatus* coletado a montante da barragem de Itutinga em 2023. Marcador de peso molecular (canaleta central (L)) de 25pb.



Figura 3 - Resolução eletroforética de PCR em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio, para amplificação de 20 amostras de *P. lineatus* coletado a montante da barragem de Itutinga em 2023. Marcador de peso molecular (canaleta central (L)) de 25pb.

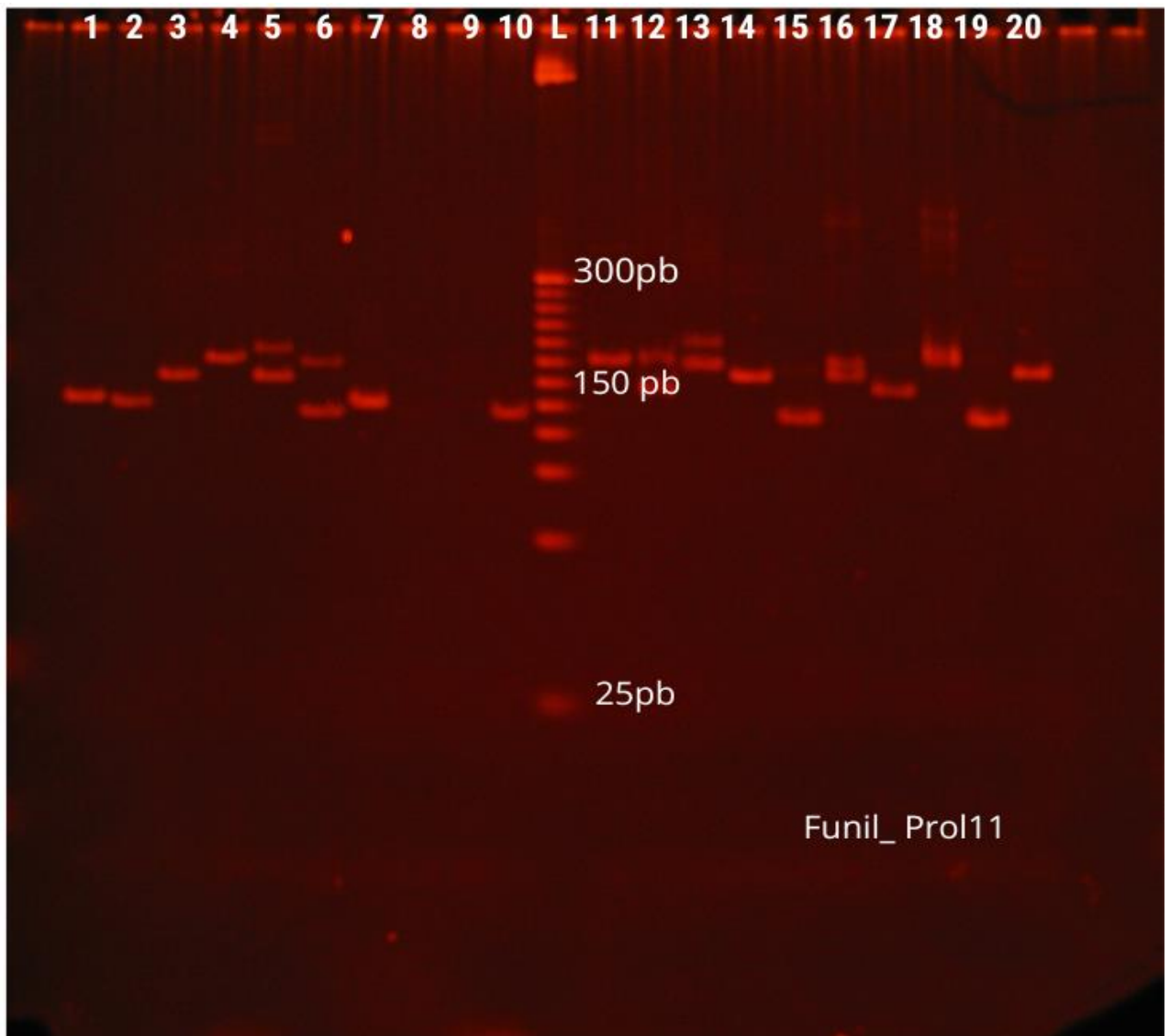


Figura 4 - Resolução eletroforética de PCR em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio, para amplificação de 20 amostras de *P. lineatus* coletado a montante da barragem de Funil em 2013. Marcador de peso molecular (canaleta central (L)) de 25pb.



Figura 5 - Amostra populacional de Camargos. Cada barra vertical indica um indivíduo da amostra (conforme ordenado por ID).



Figura 6 - Amostra populacional de Itutinga 1. Cada barra vertical indica um indivíduo da amostra (conforme ordenado por ID).



Figura 7 - Amostra populacional de Itutinga 2. Cada barra vertical indica um indivíduo da amostra (conforme ordenado por ID).

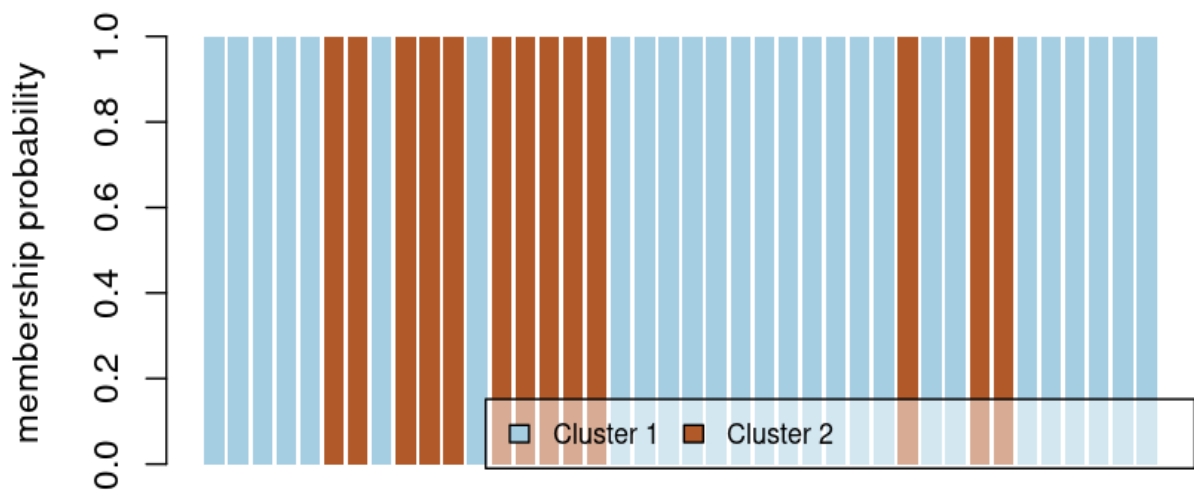


Figura 8 - Amostra populacional de Funil. Cada barra vertical indica um indivíduo da amostra (conforme ordenado por ID).

APÊNDICE B - TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela 1 - Resultados da presença de alelos privados e suas respectivas frequências nas populações amostradas.

Pop	Locus	Alelo	Freq. (respectiva)	
Camargos	prol01	15; 22	0,029; 0,088	
	prol03	20; 25	0,154; 0,038	
	prol10	24	0,063	
	prol54	24; 28	0,088; 0,059	
Itutinga_1	prol02	19; 23	0,015; 0,015	
	prol03	23; 26	0,016; 0,016	
	prol05	25	0,019	
	prol06	13	0,118	
	prol10	6; 22; 15	0,015; 0,030; 0,015	
	prol11	21; 22; 23	0,150; 0,050; 0,017	
	Prol19	19	0,017	
	prol54	4; 10	0,015; 0,044	
Itutinga_2	prol01	21; 23; 24	0,044; 0,029; 0,029	
	prol02	21; 22; 23	0,014; 0,014; 0,014	
	prol03	24; 27	0,026; 0,061; 0,051	
	prol04	1; 2; 12; 13; 14	0,061; 0,076; 0,106; 0,061; 0,015	
	prol05	31	0,013	
	prol06	16; 17; 18 13; 14; 15; 16; 17; 18;	0,019; 0,019; 0,019 0,019; 0,037; 0,037; 0,037; 0,019;	
	prol07	19; 20	0,093; 0,074; 0,019	
	prol08	12; 13	0,026; 0,026	
	prol10	23; 25	0,037; 0,111	
	prol12	17	0,031; 0,016	
	Prol19	1	0,032	
	prol54	2	0,029; 0,015	
	prol57	25	0,014; 0,014; 0,014	
	Funil	prol03	2	0,013; 0,051
		prol04	23; 24; 25	0,038; 0,051; 0,013
prol06		14	0,034	
prol08		11	0,016	
prol11		1	0,050; 0,017	
prol12		18; 20; 21; 22; 23	0,032; 0,032; 0,048; 0,016; 0,016	
Prol19		18	0,061	
prol53		13	0,013	
prol54		1	0,100	
prol57		1; 21; 24	0,016; 0,016; 0,016	

Tabela 2 - Informações de identificação dos indivíduos, populações amostradas a que pertencem e o cluster a que foi atribuído por meio da análise de agrupamentos hierárquica. Ordem de classificação a partir da identificação dos indivíduos amostrados. ID= Identificação de cada indivíduo, Pop= Populações amostradas, C1 = cluster de 1ª ordem, C2= cluster de 2ª ordem e C3 =cluster de 3ª ordem.

ID	Pop	C1	C2	C3
1	Camargos	1	1	1
2	Camargos	1	1	1
3	Camargos	1	1	1
4	Camargos	2	3	2
5	Camargos	2	4	4
6	Camargos	2	4	4
7	Camargos	2	4	4
8	Camargos	2	3	2
9	Camargos	2	3	7
10	Camargos	2	4	4
11	Camargos	2	4	8
12	Camargos	2	4	4
13	Camargos	1	1	1
14	Camargos	1	2	3
15	Camargos	1	2	5
16	Camargos	2	3	7
17	Camargos	1	1	6
18	Camargos	1	2	5
19	Camargos	2	3	7
20	Camargos	1	1	1
21	Itutinga 1	2	4	8
22	Itutinga 1	2	4	4
23	Itutinga 1	2	4	4
24	Itutinga 1	1	2	3
25	Itutinga 1	2	3	2
26	Itutinga 1	1	1	6
27	Itutinga 1	2	4	8
28	Itutinga 1	1	1	6

29	Itutinga 1	2	4	8
30	Itutinga 1	2	3	7
31	Itutinga 1	2	4	4
32	Itutinga 1	2	3	7
33	Itutinga 1	1	1	6
34	Itutinga 1	2	3	2
35	Itutinga 1	2	4	8
36	Itutinga 1	1	1	6
37	Itutinga 1	2	4	8
38	Itutinga 1	2	3	2
39	Itutinga 1	1	1	1
40	Itutinga 1	1	2	5
41	Itutinga 1	2	3	2
42	Itutinga 1	1	2	3
43	Itutinga 1	2	3	2
44	Itutinga 1	1	1	1
45	Itutinga 1	1	2	3
46	Itutinga 1	2	4	8
47	Itutinga 1	2	4	8
48	Itutinga 1	2	3	7
49	Itutinga 1	1	1	1
50	Itutinga 1	1	2	3
51	Itutinga 1	2	3	7
52	Itutinga 1	2	3	7
53	Itutinga 1	2	3	7
54	Itutinga 1	2	4	4
55	Itutinga 1	1	2	5
56	Itutinga 1	2	3	7
57	Itutinga 1	2	3	7
58	Itutinga 1	1	2	5
59	Itutinga 1	1	2	3
60	Itutinga 1	1	2	5

61	Itutinga 2	1	1	1
62	Itutinga 2	1	2	5
63	Itutinga 2	1	1	6
64	Itutinga 2	1	1	6
65	Itutinga 2	1	2	5
66	Itutinga 2	2	3	7
67	Itutinga 2	1	2	5
68	Itutinga 2	2	3	2
69	Itutinga 2	1	1	6
70	Itutinga 2	1	2	5
71	Itutinga 2	2	4	4
72	Itutinga 2	1	2	5
73	Itutinga 2	2	3	2
74	Itutinga 2	1	2	3
75	Itutinga 2	1	2	3
76	Itutinga 2	2	4	8
77	Itutinga 2	2	3	7
78	Itutinga 2	1	2	3
79	Itutinga 2	2	3	2
80	Itutinga 2	1	1	6
81	Itutinga 2	1	1	6
82	Itutinga 2	2	4	4
83	Itutinga 2	1	1	1
84	Itutinga 2	1	1	1
85	Itutinga 2	1	1	6
86	Itutinga 2	2	4	8
87	Itutinga 2	1	1	1
88	Itutinga 2	1	2	3
89	Itutinga 2	2	4	8
90	Itutinga 2	2	4	8
91	Itutinga 2	1	1	1
92	Itutinga 2	1	1	6

93	Itutinga 2	1	1	1
94	Itutinga 2	1	1	1
95	Itutinga 2	1	1	1
96	Itutinga 2	1	1	6
97	Itutinga 2	1	1	6
98	Itutinga 2	1	1	6
99	Itutinga 2	2	3	2
100	Itutinga 2	2	3	2
101	Funil	2	3	2
102	Funil	2	3	2
103	Funil	2	3	2
104	Funil	2	3	7
105	Funil	1	2	5
106	Funil	2	3	7
107	Funil	2	3	2
108	Funil	2	3	7
109	Funil	1	2	3
110	Funil	1	2	3
111	Funil	1	1	1
112	Funil	2	4	8
113	Funil	2	3	2
114	Funil	1	2	5
115	Funil	1	2	5
116	Funil	1	2	3
117	Funil	2	4	8
118	Funil	1	1	1
119	Funil	1	1	6
120	Funil	1	1	6
121	Funil	2	4	8
122	Funil	2	3	2
123	Funil	2	3	7
124	Funil	2	3	2

125	Funil	2	4	8
126	Funil	2	4	8
127	Funil	2	4	8
128	Funil	1	2	5
129	Funil	2	4	8
130	Funil	1	2	5
131	Funil	2	3	2
132	Funil	1	2	5
133	Funil	1	1	6
134	Funil	1	1	6
135	Funil	2	4	4
136	Funil	2	3	7
137	Funil	1	2	3
138	Funil	2	3	7
139	Funil	1	2	3
140	Funil	1	2	5

Tabela 3- com informações de identificação dos indivíduos, populações amostradas a que pertencem e o cluster a que foi atribuído por meio da análise de agrupamentos hierárquica. Ordem de classificação a partir do cluster C3 contendo 8 agrupamentos genéticos. ID= Identificação de cada indivíduo, Pop= Populações amostradas, C1 = cluster de 1ª ordem, C2= cluster de 2ª ordem e C3 =cluster de 3ª ordem.

ID	Pop	C1	C2	C3
1	Camargos	1	1	1
2	Camargos	1	1	1
3	Camargos	1	1	1
13	Camargos	1	1	1
20	Camargos	1	1	1
39	Itutinga 1	1	1	1
44	Itutinga 1	1	1	1
49	Itutinga 1	1	1	1
61	Itutinga 2	1	1	1
83	Itutinga 2	1	1	1
84	Itutinga 2	1	1	1
87	Itutinga 2	1	1	1
91	Itutinga 2	1	1	1
93	Itutinga 2	1	1	1
94	Itutinga 2	1	1	1
95	Itutinga 2	1	1	1
111	Funil	1	1	1
118	Funil	1	1	1
4	Camargos	2	3	2
8	Camargos	2	3	2
25	Itutinga 1	2	3	2
34	Itutinga 1	2	3	2
38	Itutinga 1	2	3	2
41	Itutinga 1	2	3	2
43	Itutinga 1	2	3	2
68	Itutinga 2	2	3	2
73	Itutinga 2	2	3	2

79	Itutinga 2	2	3	2
99	Itutinga 2	2	3	2
100	Itutinga 2	2	3	2
101	Funil	2	3	2
102	Funil	2	3	2
103	Funil	2	3	2
107	Funil	2	3	2
113	Funil	2	3	2
122	Funil	2	3	2
124	Funil	2	3	2
131	Funil	2	3	2
14	Camargos	1	2	3
24	Itutinga 1	1	2	3
42	Itutinga 1	1	2	3
45	Itutinga 1	1	2	3
50	Itutinga 1	1	2	3
59	Itutinga 1	1	2	3
74	Itutinga 2	1	2	3
75	Itutinga 2	1	2	3
78	Itutinga 2	1	2	3
88	Itutinga 2	1	2	3
109	Funil	1	2	3
110	Funil	1	2	3
116	Funil	1	2	3
137	Funil	1	2	3
139	Funil	1	2	3
5	Camargos	2	4	4
6	Camargos	2	4	4
7	Camargos	2	4	4
10	Camargos	2	4	4
12	Camargos	2	4	4

22	Itutinga 1	2	4	4
23	Itutinga 1	2	4	4
31	Itutinga 1	2	4	4
54	Itutinga 1	2	4	4
71	Itutinga 2	2	4	4
82	Itutinga 2	2	4	4
135	Funil	2	4	4
15	Camargos	1	2	5
18	Camargos	1	2	5
40	Itutinga 1	1	2	5
55	Itutinga 1	1	2	5
58	Itutinga 1	1	2	5
60	Itutinga 1	1	2	5
62	Itutinga 2	1	2	5
65	Itutinga 2	1	2	5
67	Itutinga 2	1	2	5
70	Itutinga 2	1	2	5
72	Itutinga 2	1	2	5
105	Funil	1	2	5
114	Funil	1	2	5
115	Funil	1	2	5
128	Funil	1	2	5
130	Funil	1	2	5
132	Funil	1	2	5
140	Funil	1	2	5
17	Camargos	1	1	6
26	Itutinga 1	1	1	6
28	Itutinga 1	1	1	6
33	Itutinga 1	1	1	6
36	Itutinga 1	1	1	6
63	Itutinga 2	1	1	6

64	Itutinga 2	1	1	6
69	Itutinga 2	1	1	6
80	Itutinga 2	1	1	6
81	Itutinga 2	1	1	6
85	Itutinga 2	1	1	6
92	Itutinga 2	1	1	6
96	Itutinga 2	1	1	6
97	Itutinga 2	1	1	6
98	Itutinga 2	1	1	6
119	Funil	1	1	6
120	Funil	1	1	6
133	Funil	1	1	6
134	Funil	1	1	6
9	Camargos	2	3	7
16	Camargos	2	3	7
19	Camargos	2	3	7
30	Itutinga 1	2	3	7
32	Itutinga 1	2	3	7
48	Itutinga 1	2	3	7
51	Itutinga 1	2	3	7
52	Itutinga 1	2	3	7
53	Itutinga 1	2	3	7
56	Itutinga 1	2	3	7
57	Itutinga 1	2	3	7
66	Itutinga 2	2	3	7
77	Itutinga 2	2	3	7
104	Funil	2	3	7
106	Funil	2	3	7
108	Funil	2	3	7
123	Funil	2	3	7
136	Funil	2	3	7

138	Funil	2	3	7
11	Camargos	2	4	8
21	Itutinga 1	2	4	8
27	Itutinga 1	2	4	8
29	Itutinga 1	2	4	8
35	Itutinga 1	2	4	8
37	Itutinga 1	2	4	8
46	Itutinga 1	2	4	8
47	Itutinga 1	2	4	8
76	Itutinga 2	2	4	8
86	Itutinga 2	2	4	8
89	Itutinga 2	2	4	8
90	Itutinga 2	2	4	8
112	Funil	2	4	8
117	Funil	2	4	8
121	Funil	2	4	8
125	Funil	2	4	8
126	Funil	2	4	8
127	Funil	2	4	8
129	Funil	2	4	8