



**SUBPROJETO III B. DINÂMICA POPULACIONAL E EVOLUTIVA DA
ICTIOFAUNA NA BACIA DO RIO DOCE - ANÁLISE POPULACIONAL COM USO
DE MICROSSATÉLITES**

Dr. Jorge A. Dergam - UFV

Dra. Valéria Nogueira Machado – UFAM

Outubro 2022

SUMÁRIO EXECUTIVO	3
1 OBJETIVOS	4
2 INTRODUÇÃO	4
3 METODOLOGIA MICROSSATÉLITES	10
4 RESULTADOS	16
4.1 PARÂMETROS GENÉTICOS	16
4.2 ANÁLISE DAPC	28
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	34
7 BIBLIOGRAFIA.....	36
ANEXO 1.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O Lambari <i>Astyanax lacustris</i> (Lütken 1875).....	7
Figura 2: A Traíra <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794).....	8
Figura 3: O Acará <i>Geophagus brasiliensis</i> (Quoy & Gaimard 1824).....	9
Figura 4: A Curvina <i>Pachyurus adspersus</i> (Steindachner 1879).....	9
Figura 5: Mapa da bacia hidrográfica do Rio Doce. Pontos em verde são pontos-referência, representados por afluentes que não tiveram contato com o rejeito. As áreas afetadas pelo rejeito estão representadas por pontos vermelhos.	10
Figura 6: Análise Discriminante de Componentes Principais das variações de microssatélites obtidas em populações do Lambari-de-rabo amarelo <i>Astyanax lacustris</i>	29
Figura 7: Análise Discriminante de Componentes Principais das variações de microssatélites obtidas em populações de Traíra <i>Hoplias malabaricus</i> . O Baixo Rio Doce está representado pelos nomes ano 1, ano 2 e ano 3 e são resultados dos 3 anos de atividades do PMBA.....	30
Figura 8: Análise Discriminante de Componentes Principais das variações de microssatélites obtidas em populações de Acará <i>Geophagus brasiliensis</i>	31
Figura 9: Análise Discriminante de Componentes Principais das variações de microssatélites obtidas em populações da Curvina <i>Pachyurus adspersus</i>	32
Figura 10: Linhagens do Acará <i>Geophagus brasiliensis</i> , detectadas com o uso da ferramenta molecular barcode, na bacia do Rio Doce. As localidades são indicadas na Tabela 1 (a continuação).	41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Localização, coordenadas geográficas, data da coleta no período chuvoso e seco. Área afetada se refere a trechos que tiveram contato direto com a passagem do rejeito 11
- Tabela 2: Espécies, tamanhos amostrais, locais, seções da bacia, condições de impacto e identificação dos pontos na malha amostral dos espécimes analisados com a técnica de microssatélites. Quando necessário, dados de *G. brasiliensis*, *Hoplias malabaricus* e *P. adspersus* coletados no PMBA foram utilizados para fins comparativos. 18
- Tabela 3: Resultados dos parâmetros genéticos obtidos em quatro espécies da bacia do Rio Doce. N = tamanho da amostra, F_{ST} , F_{IS} e G-W são índices que estimam o grau de endocruzamento dos indivíduos e das populações. Valores em negrito indicam valor significativo a 5%. As espécies e seus parâmetros estão identificados por cores. 24
- Tabela 4: Valores p das comparações pareadas das populações do Lambari *Astyanax lacustris* analisadas com microssatélites da bacia do Rio Doce. Localidades: 1 - Alto Rio Doce; 2 – Baixo Rio Doce; 3 – Rio Manhuaçu; 4 – Médio Rio Doce; 5 – Rio Santo Antônio; 6 – Rio Suaçuí. Valores em negrito são significativos ao nível de 0,05. 26
- Tabela 5: Valores p das comparações pareadas das populações do Acará *Geophagus brasiliensis* analisadas com microssatélites da bacia do Rio Doce. Localidades: 1 - Alto Rio Doce; 2 – Baixo Rio Doce; 3 – Rio Manhuaçu; 4 – Piranga. Valores em negrito são significativos ao nível de 0,05. 27
- Tabela 6: Valores p das comparações pareadas das populações da Traíra *Hoplias malabaricus*, analisadas com microssatélites da bacia do Rio Doce. Localidades: 1 - Alto Rio Doce; 2 – Baixo Rio Doce; 3 – Médio Rio Doce. Valores em negrito são significativos ao nível de 0,05. 27
- Tabela 7: Valores p das comparações pareadas das populações da Curvina *Pachyurus adspersus* analisadas com microssatélites da bacia do Rio Doce. Localidades: 1 - Baixo Rio Doce; 2 – Médio Rio Doce; 3 – Rio Piranga; 4 – Rio Santo Antônio. Valores em negrito são significativos ao nível de 0,05. 28
- Tabela 8: Localidades selecionadas da Figura 1. O Grupo 1 é representado por espécime do alto Rio Doce e aparentado com um indivíduo do Paraíba do Sul. O Grupo 2 é formado por espécimes do Médio e Baixo Rio Doce. O Grupo 3 é formado por indivíduos do Alto e Médio Rio Doce. 42

SUMÁRIO EXECUTIVO

A análise molecular utilizando microssatélites em quatro espécies de peixes: o lambari *Astyanax lacustris*, o acará *Geophagus brasiliensis*, a curvina *Pachyurus adspersus* e a traíra *Hoplias malabaricus* da bacia do Rio Doce, permitiu definir aspectos gerais dos padrões de variação que são relevantes para o estabelecimento de uma linha histórica de referência e como subsídio para medidas mitigadoras dos impactos no ecossistema aquático na bacia. Os padrões gerais obtidos com microssatélites, mostram uma estruturação intensa das quatro espécies ao longo da calha do Rio Doce e dos tributários entre si e com a calha. Os índices genéticos clássicos de Wright F_{IS} (coeficiente de endocruzamento de cada indivíduo) e F_{ST} (a proporção da variância total contida dentro das populações em relação à variância total das populações) foram majoritariamente significativas para todas as espécies, exceto no Lambari *Astyanax lacustris*, que apresentou valores não significativos entre o trecho do Baixo Rio Doce com o Rio Manhuaçu, entre os rios Manhuaçu e o Santo Antônio e entre o Médio Rio Doce com o Rio Santo Antônio. Da mesma forma, a Curvina *Pachyurus adspersus* não apresentou valores significativos entre o Médio e o Baixo Rio Doce. assim

como um valor não significativo de F_{IS} . O índice Garza-Williamson, que expressa gargalos genéticos recentes, também foi significativo em todas as amostras. As comparações dos padrões de frequências alélicas obtidas neste projeto com as obtidas pelo PMBA no baixo Rio Doce são consistentes com a capacidade conhecida de dispersão de cada espécie. Embora o Lambari não seja considerado uma espécie com comportamento de piracema, a homogeneidade de suas populações pode ser devida à existência de grandes populações mais resilientes perdas alélicas. Já no caso do Acará, parte de sua estrutura populacional pode ser consequência da existência de linhagens múltiplas. As comparações par-a-par dos valores de F_{ST} assim como valores divergentes de diversidade gênica (ou de heterozigosidade esperada) permitiram definir tributários como os rios Piranga, Santo Antônio e Manhuaçu com maior grau de estruturação e que merecem atenção especial em termos de conservação. Os dados obtidos apontam para a perda de interconexão entre os segmentos da calha e graus variáveis dependendo da espécie, entre a calha e os afluentes.

1 OBJETIVOS

- Avaliar temporalmente a variabilidade e estruturação genética das populações de peixes dos tributários e da calha principal da bacia do Rio Doce.
- Ampliar o conhecimento sobre a diversidade e a distribuição da ictiofauna da bacia do Rio Doce
- Produzir um ranking da importância ecológica e conservacionista de cada tributário baseado na contribuição potencial ou real do seu aporte de peixes para a calha principal.
- Investigar a conectividade (fluxo gênico entre as populações de espécies de peixes) entre os tributários e a calha principal do Rio Doce.
- Produzir um estudo da história evolutiva recente da ictiofauna da bacia do Rio Doce.

2 INTRODUÇÃO

Em 05 de novembro de 2015, a ruptura da Barragem de Fundão causou a liberação de aproximadamente 60 milhões de metros cúbicos de rejeito de minério que desceram como uma onda de alta energia, chegando à foz do Rio Doce no dia 22 do mesmo mês e percorrendo mais de 600 km (MARTA-ALMEIDA, 2016; QUEIROZ et al., 2022). Os impactos causados pela passagem do material de descarte da barragem de Fundão foram relativamente bem documentados: no dia 10 de novembro de 2015, o decreto 46.892/2015 emitido pelo Governo do estado de Minas Gerais, instituiu uma força-tarefa para a avaliação dos danos causados pela passagem do rejeito nos municípios do estado (SEMAD, 2016). Como parte dessa iniciativa, foi realizado um resumo com base nos relatórios da SEMAD e do IBAMA, que estimaram a mortandade em mais de 11 toneladas de peixes. Porém, o

próprio relatório apontou os obstáculos para uma avaliação mais objetiva dessa mortandade, considerando que grande parte dos peixes mortos ficou soterrada no próprio rejeito de minério.

Por outro lado, a composição taxonômica dos peixes mortos foi abordada pelo relatório do IBAMA (2016), a partir de atividades de campo realizadas no período de 16 a 23 de novembro entre Baixo Guandu e Linhares, quando 6 a 13 pessoas percorreram os aproximadamente 150 km de rio. A atividade resultou na coleta de 7.410 peixes mortos correspondentes a 21 espécies. Além desse esforço, a coleta de peixes no rio e estuário alcançou 29.300 indivíduos que corresponderam a 14 toneladas de biomassa de peixes.

A mortandade provocada pela passagem do rejeito pode ser explicada por dois fatores abióticos: a grande turbidez e a depleção de oxigênio dissolvido; esses fatores podem ter sido agravados pelo fato que a vazão dos tributários era particularmente baixa na data da ruptura. Em Minas Gerais, a turbidez de 5 NTUs, anterior à chegada do rejeito, aumentou para 12.258 NTUs no dia da chegada do rejeito e 228.229 NTUs nos três dias seguintes (CHAVES et al., 2016). Esses valores foram 2 mil vezes mais elevados que o nível aceitável para o máximo aceitável de 100 NTUs para rios Classe 2 segundo o DN COPAM CERH No. 001/2008.

De forma simultânea ao aumento da turbidez, ocorreu uma diminuição drástica dos níveis de oxigênio dissolvido. Oito dias após a ruptura da barragem de Fundão, o teor de oxigênio dissolvido do Rio Doce em Conselheiro Pena foi de 1,1 mg/L, sendo muito inferior ao mínimo previsto para os rios Classe 2 (5,0 mg/L). Nos dias 18, 19 e 20 de novembro, ou seja, treze, quatorze e quinze dias depois da ruptura da barragem de Fundão, o Rio Doce em Aimorés, apresentou teores de oxigênio inferiores ou iguais ao mínimo para os rios Classe 2 (4,4; 5,2 e 5,0 respectivamente) (IGAM, 2021). Também foi observado uma redução da média do teor de oxigênio até 500 km da barragem de Fundão (IGAM, 2021), sugerindo um período mais curto de permanência das condições anóxicas a partir de Conselheiro Pena. Além da mortalidade imediata, este profundo distúrbio afetou de forma desconhecida as espécies de peixes da calha do Rio Doce, tanto em seus aspectos demográficos como na capacidade de manterem populações viáveis entre as possíveis metapopulações (HANSKI, 1998).

A relação entre metapopulações e a genética é evidente: a perda de alelos derivada da extinção e substituição de populações aumenta a deriva genética, reduzindo a diversidade alélica neutra dentro de populações locais e no conjunto das metapopulações (OVASKAINEN; SAASTAMOINEN, 2018). No processo de aumento ou declínio das populações, o tamanho efetivo de uma população local pode ser muito menor que o tamanho do censo dos indivíduos e a recuperação da riqueza alélica dependerá das taxas de imigração, o qual representa um dos aspectos do “efeito-resgate” (BROWN; KODRIC-BROWN, 1977). A independência da variação genética do aspecto demográfico é evidente, por exemplo, no rápido crescimento populacional de espécies introduzidas como a Piranha-vermelha *Pygocentrus nattereri*, a qual provavelmente foi estabelecida a partir de poucos indivíduos (RRDM, 2021)

Esta mortalidade pode ter afetado a demografia e a variabilidade genética das espécies de peixes e este projeto objetiva um estudo preliminar desses efeitos, utilizando os padrões de variação dos microssatélites. Os microssatélites (LITT; LUTTY, 1989), também chamados de STRs (*short tandem repeats*) encontram-se dentro da grande categoria de regiões nucleares variáveis de nucleotídeos repetidos de um até oito vezes (RICHARD et al., 2008); esses nucleotídeos são também chamados *DNA motifs* e pertencem ao grupo de sequências repetidas em tandem (VNTR, em inglês), junto com outro grupo de marcadores, os minissatélites (WRIGHT, 1994).

Os microssatélites são regiões curtas de DNA bastante frequentes no genoma, ocorrendo na faixa de milhares a dezenas de milhares de cópias e estão afastadas entre elas por espaços geralmente menores que 1 kilobase (1 kilobase = 1000 pares de bases). Alguns microssatélites apresentam baixos níveis de repetição. A grande maioria destes marcadores se encontra dispersa no genoma, mas são mais frequentes em regiões não codificadoras do que em regiões codificadoras (GRAUR, 2016).

Os microssatélites apresentam grande abundância nos genomas de organismos eucariotos e sofrem uma alta taxa de mutações. Essas mutações ocorrem como variações nos comprimentos dos microssatélites, como consequência de erros na replicação do DNA e podem gerar um grande número de alelos por locus (até 50), como demonstrado para o bacalhau do Atlântico *Gadus morhua* (BROOKER, et al. 1994). Em análises de genética de populações, assume-se que estes marcadores são de caráter seletivamente neutro e são, portanto, informativos para entender processos genéticos como gargalos populacionais (WRIGHT; BENTZEN, 1994), adaptações locais (NIELSEN, 2005), tamanho populacional e fluxo gênico (SLATKIN, 1995; GAGGIOTTI et al., 1999).

Nas últimas duas décadas, o desenvolvimento de técnicas como os microssatélites tem permitido a varredura rápida do genoma em diversas espécies de peixes neotropicais, com diferentes objetivos. Este projeto não visa a revisão de todos os trabalhos publicados e por esse motivo; os trabalhos citados são apenas ilustrativos dos grupos taxonômicos-alvo e dos objetivos dos estudos. Barbosa et al. (2006) desenvolveram *primers* para a curimba *Prochilodus argenteus*, uma espécie de grande relevância econômica e em 2008, Barbosa e colaboradores desenvolveram *primers* para *Prochilodus costatus* e *Prochilodus lineatus*. Posteriormente, Pimentel et al. (2018) desenvolveram um método de triagem de alelos utilizando microssatélites em *Prochilodus costatus*. Souza et al. (2018) desenvolveram *primers* de microssatélites para *Brycon orbignyanus*, uma espécie de peixe caraciforme sensível a alterações ambientais e de ampla distribuição na bacia do Rio de la Plata e outras bacias; Yazbeck et al. (2018) publicaram um painel genômico para essa mesma espécie. Zaganini et al. (2012) obtiveram *primers* para o lambari-de-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae*, de ampla distribuição na bacia do Rio Paraná. Quérouil et al. (2015) obtiveram *primers* de microssatélites em ciclídeos do gênero *Apistogramma*, com o objetivo de separar linhagens dentro do táxon, estabelecer padrões filogeográficos e promover a conservação de populações. Ferreira et al. (2013) desenvolveram 14 *primers* para o complexo de espécies do acará *Geophagus brasiliensis*. Finalmente, Villanova et al. (2015) desenvolveram *primers* de microssatélites para o piau *Leporinus obtusidens*.

Este projeto é o primeiro que tem como objetivo, a avaliação da estrutura genética utilizando marcadores de microssatélites de quatro espécies de peixes em toda a bacia do Rio Doce. As análises ficaram restritas às espécies que apresentaram maior tamanho amostral suficiente em áreas impactadas e não impactadas pelo rejeito de minério.

Dentre as espécies selecionadas, duas espécies pertencem à ordem Characiformes: o Lambari-de-rabo-amarelo *Astyanax lacustris* e a predadora Traíra *Hoplias malabaricus*. Além delas, foi selecionada uma espécie da ordem Cichliformes, o Acará *Geophagus brasiliensis* e uma espécie da ordem Perciformes, a Curvina do Rio Doce, *Pachyurus adspersus*. É relevante lembrar alguns aspectos da ecologia e da genética de cada espécie, conforme o relatório do ano 3 (RRDM, 2021). Todas elas são de ampla distribuição na bacia e as extensas análises feitas pelo PMBA utilizando barcode (COI), indicam que apresentam um número variável de linhagens com profundo grau de divergência que podem indicar a existência de possíveis espécies dentro de cada espécie morfológica. O uso do barcode tem sido muito estimulado pela facilidade de obtenção desses dados. A citocromo-oxidase subunidade I (COI) é um gene localizado no DNA mitocondrial, herdado da linha materna (corresponde ao sobrenome materno de cada indivíduo) e portanto, conta apenas um aspecto da história do indivíduo. Dependendo da espécie, é necessário determinar se os indivíduos portadores de COI muito divergentes cruzam entre si ou não. Se há cruzamento, as variações representam fragmentos históricos dentro da mesma espécie. Por outro lado, se não há cruzamento em simpatria, então os dados barcode estão sim, representando os limites entre espécies. Por esse motivo, o uso de marcadores nucleares como microssatélites, cromossômicos ou Radseq é relevante para uma melhor compreensão das variações mitocondriais e podem apresentar resultados incongruentes entre si (ex. TING et al.2008; SOTA; VOGLER, 2001; HIRANO et al., 2019).

Figura 1: O Lambari *Astyanax lacustris* (Lütken 1875)



Esta espécie é a que apresenta maior ocorrência em toda a bacia (Figura 1). Está dentro das dez espécies com maiores índices de recrutamento, ocupando a oitava posição. Os machos apresentam relação gonadossomática relativamente constante ao longo do ano, enquanto que as fêmeas apresentam um aumento dessa relação no período chuvoso, sendo que a média da RGS do terceiro ano foi significativamente maior que as dos anos anteriores. O fator de condição, que expressa o

bem-estar do peixe, se manteve constante para os dois sexos ao longo do ano. Foi considerada como espécie tolerante às condições existentes nos locais afetados pela passagem ou presença do rejeito de minério. Apresentou hábitos insetívoros terrestres no Baixo Rio Doce. Em termos genéticos, as análises com microssatélites realizadas no Baixo Rio Doce mostraram que *A. lacustris* e o Lambari *Deuterodon intermedius* foram as espécies que apresentaram maior número de alelos, maior amplitude no tamanho dos alelos e maior diversidade gênica em relação a todas as outras espécies analisadas. Os valores de F_{ST} foram não significativos nos dois primeiros anos, mas eles se tornaram significativos no terceiro ano. Em termos de barcode, a análise indica que *A. lacustris* é formada por mais de uma linhagem na bacia do Rio Doce (2-12 dependendo do algoritmo de delimitação de espécie utilizado). Este alto nível de variação já tinha sido indicado por Cunha et al. (2019), que indicaram também alto nível de homogeneidade cariotípica entre as amostras.

Figura 2: A Traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)



A traíra é também uma espécie de ampla distribuição na bacia e tem sido objeto de numerosos estudos (Figura 2). Ocupa a décima-terceira posição no ranqueamento de recrutamento no Baixo Rio Doce. Apresenta condições de reprodução durante o ano todo. Da mesma forma que o lambari, é uma espécie tolerante às condições atuais das áreas afetadas pelo rejeito de minério. A dieta da espécie sofre alterações ao longo das fases de vida e no Baixo Rio Doce, apresenta hábitos piscívoros. As análises de barcode indicam que esta espécie é representada por um máximo de 24 e um mínimo de quatro linhagens na bacia do Rio Doce, assim como pela presença de duas formas cariotípicas: uma delas apresenta cromossomos sexuais do sistema XX/XY e outro não apresenta esse tipo diferenciado de cromossomos (JACOBINA et al., 2011). Estudos realizados com abordagens citogenéticas e moleculares também indicam uma complexa relação filogeográfica entre as populações da bacia do Rio Doce com as bacias costeiras do nordeste e do sul do país (SANTOS et al., 2009).

Figura 3: O Acará *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824)



O acará tem uma ampla ocorrência na bacia do Rio Doce (Figura 3). Está dentro das dez espécies com maiores índices de recrutamento, ocupando a terceira posição. Sua reprodução ocorre durante a primavera e o verão, com maior intensidade durante a época de chuvas. É uma das espécies tolerantes às condições preponderantes dos locais onde o rejeito de minério passou ou ainda se encontra no substrato. Sua dieta é de invertebrados e algas presentes no substrato e os espécimes coletados no Baixo Rio Doce foram considerados de hábito alimentar invertívoro, consumindo insetos aquáticos, moluscos e microcrustáceos. Nas análises genéticas, três linhagens foram detectadas na bacia (ver também Anexo deste relatório), sendo que a variante do Baixo Rio Doce foi considerada como pertencente a *Geophagus santosi*.

Figura 4: A Curvina *Pachyurus adspersus* (Steindachner 1879)



Esta espécie é de ampla ocorrência na bacia e uma das mais abundantes (Figura 4). Ocupa o primeiro lugar no ranqueamento de recrutamento no Baixo Rio Doce, com abundância de juvenis nesse trecho do rio. É uma espécie de grande relevância na pesca artesanal. Ocorre tanto em ambientes de água parada como corrente e em diferentes tipos de substrato. Alimenta-se de pequenos invertebrados aquáticos, como larvas de Chironomidade, Ephemeroptera e Odonata. Em termos de reprodução, o pico das atividades reprodutivas ocorre nos meses chuvosos e é mais evidente nas fêmeas. Da mesma forma que no Lambari *A. lacustris*, a relação gonadossomática nas

fêmeas, foi significativamente maior no ano 3 do que nos dois anos anteriores, no Baixo Rio Doce. Em termos de tolerância às condições predominantes nos locais atingidos pelo rejeito de minério, ela foi considerada como intolerante, por apresentar um grau intermediário de estresse oxidativo (a ser apresentado no subprojeto V deste projeto). A análise discriminante de componentes principais indica homogeneidade da espécie no Baixo Rio Doce, com duas variantes de *COI*, as quais foram consideradas como pertencentes à uma linhagem única; foi a espécie que apresentou os menores níveis de diversidade nesse tipo de marcadores, mesmo sendo a espécie que apresentou maior tamanho amostral em todos os locais de coleta.

Como parte da avaliação dos efeitos biológicos do desastre, os dados sobre a divergência genética de populações são essenciais para compreender aspectos demográficos das espécies escolhidas. Eles também permitem embasar o modelo conceitual do impacto do rejeito de minério nesta fauna e interpretar de maneira objetiva, a realidade da persistência e de resposta das populações aos processos históricos de degradação da bacia e à passagem do rejeito de minério.

3 METODOLOGIA MICROSSATÉLITES

As amostras foram coletadas dentro da malha amostral do projeto (Figura 5, Tabela 1. As coletas foram iniciadas no dia 14 de fevereiro de 2020 e se encerraram em 30 de setembro de 2020. Os peixes foram coletados com redes de espera de 10 metros de comprimento e malhas de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 e 80 mm (distância entre nós), perfazendo assim um conjunto de 10 redes de 10 metros. Em cada ponto de coleta, foram utilizados dois conjuntos de redes totalizando 20 redes e 200 metros em cada ponto. As redes foram armadas no entardecer do dia (às 18:00 horas) e retiradas na manhã do dia seguinte (às 6:00 horas), perfazendo 12 horas na coluna d'água.

Amostras de tecido muscular foram obtidas de espécimes frescos ou de indivíduos coletados vivos e eutanasiados em solução contendo eugenol a 4%, um composto ativo do óleo de cravo, de acordo com a PORTARIA CFBio Nº 148/2012, que regulamenta os procedimentos de captura, contenção, marcação e coleta de animais vertebrados previstos nos Artigos, 4º, 5º, 6º e 8º da Resolução CFBio nº 301/2012 e pelo CONCEA em diretrizes para prática de eutanásia em peixes. As amostras foram fixadas imediatamente em etanol 90% e condicionadas em tubos tipo Eppendorf. Posteriormente, os tubos foram transferidos e estocados em freezer -20 °C até seu processamento.

Figura 5: Mapa da bacia hidrográfica do Rio Doce. Pontos em verde são pontos-referência, representados por afluentes que não tiveram contato com o rejeito. As áreas afetadas pelo rejeito estão representadas por pontos vermelhos.

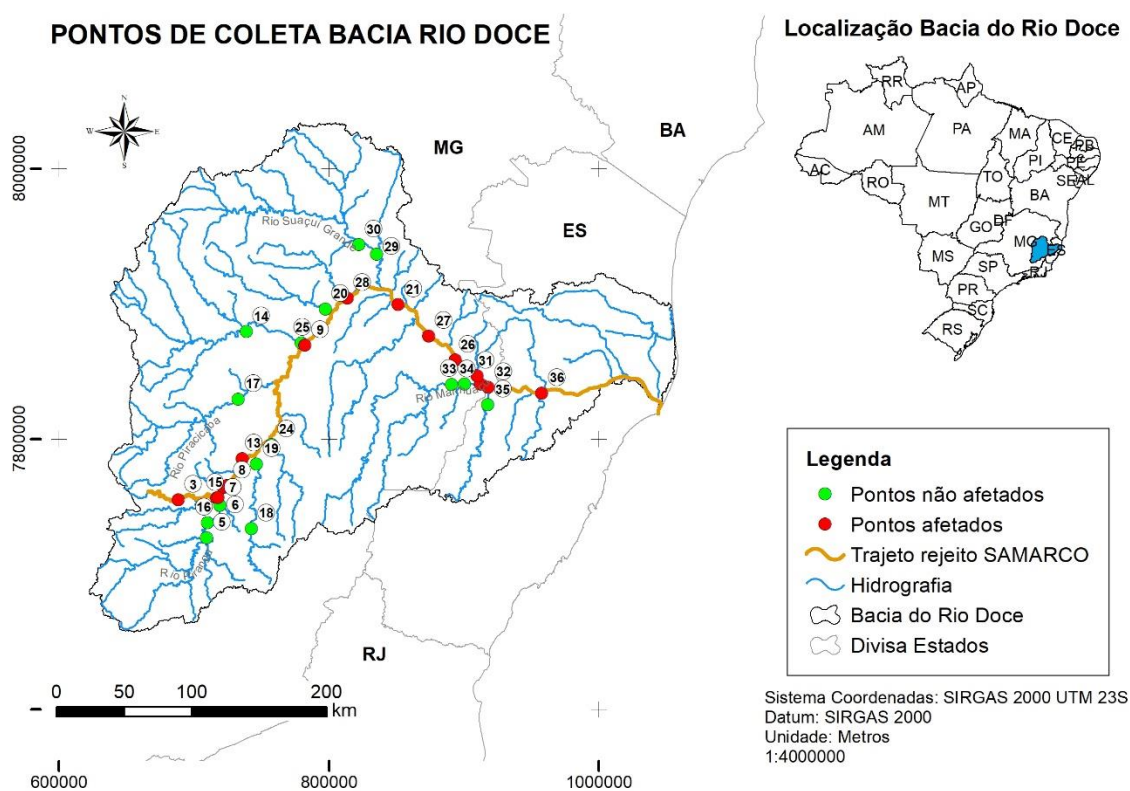


Tabela 1: Localização, coordenadas geográficas, data da coleta no período chuvoso e seco. Área afetada se refere a trechos que tiveram contato direto com a passagem do rejeito

Código do ponto	Nome da drenagem	Localidade	Coordenadas	Data coleta (chuvoso)	Data coleta (seco)	Área afetada
Ponto 3	Rio Gualaxo do Norte	Paracatu de baixo, subdistrito de Monsenhor Horta, Mariana, MG	23k 0688284 7754717	19/02/2020	11/08/2020	Sim
Ponto 4	Rio do Carmo	Barra Longa, MG	23k 0704609 7756231	03/03/2020	25/09/2020	Sim
Ponto 5	Rio Piranga	Guaraciaba, MG	23k 0709518 7726784	06/03/2020	18/08/2020	Não
Ponto 6	Rio Piranga	Rio Doce, MG	23k 0719392 7750689	29/02/2020	10/09/2020	Não

Código do ponto	Nome da drenagem	Localidade	Coordenadas	Data coleta (chuvoso)	Data coleta (seco)	Área afetada
Ponto 7	Rio Doce	Rio Doce, MG	23k 0717886 7756690	16/02/2020	05/09/2020	Sim
Ponto 8	Rio Doce	Rio Doce, MG	23k 0724451 7765328	18/02/2020	03/09/2020	Sim
Ponto 9	Rio Doce	Naque, MG	23k 0782354 7869156	19/03/2020	28/08/2020	Sim
Ponto 10	Rio Doce	Rio Doce, UHE Risoleta neves, MG	23k 0721890 7764082	15/02/2020	02/09/2020	Sim
Ponto 13	Rio Doce	São José do Goiabal, MG	23k 0735965 7785306	20/03/2020	21/08/2020	Sim
Ponto 15	Rio Carmo	Rio Doce, MG	23k 0716721 7756192	27/02/2020	04/09/2020	Sim
Ponto 16	Rio Piranga	UHE Brito, MG	23k 0710222 7737948	05/03/2020	11/09/2020	Não
Ponto 17	Rio Piracicaba	Jaguaraçu, MG	23k 0732869 7829391	13/03/2020	18/09/2020	Não
Ponto 18	Rio Casca	Jequiri, MG	23k 0742458 7733441	19/03/2020	09/09/2020	Não
Ponto 19	Rio Casca	São José do Goiabal, MG	23k 0746357 7781360	16/03/2020	12/09/2020	Não
Ponto 20	Rio Corrente	Periquito, MG	23k 0797357 7896137	10/03/2020	18/09/2020	Não
Ponto 21	Rio Doce	Tumiritinga, MG	24k 0219512 7900508	10/03/2020	02/09/2020	Sim
Ponto 22	Rio Caratinga	Barra do Cuieté, MG	24k 0233687 7890184	05/03/2020	20/08/2020	Não

Código do ponto	Nome da drenagem	Localidade	Coordenadas	Data coleta (chuvoso)	Data coleta (seco)	Área afetada
Ponto 23	Rio Doce	Aimorés, MG	24k 0282205 7844032	15/02/2020	08/09/2020	Sim
Ponto 24	Rio Matipó	Raul Soares	23k 0757449 7795917	18/03/2020	22/09/2020	Não
Ponto 25	Rio Santo Antônio	Naque, MG	23k 0779627 7871089	18/03/2020	17/09/2020	Não
Ponto 26	Rio Doce	Resplendor, MG	24k 0263294 7861088	04/03/2020	19/08/2020	Sim
Ponto 27	Rio Doce	Conselheiro Pena, MG	24k 0242767 7877983	06/03/2020	21/08/2020	Sim
Ponto 28	Rio Doce	Governador Valadares, MG	23k 0813646 7904202	11/03/2020	15/09/2020	Sim
Ponto 29	Rio Suaçuí Grande	Matias Lobato, MG	24k 0202153 7937309	11/03/2020	19/09/2020	Não
Ponto 30	Rio Suaçuí Grande	Matias Lobato, MG	24k 0188844 7943845	13/03/2020	20/09/2020	Não
Ponto 31	Rio Doce	Aimorés, MG	24k 0279689 7849766	27/02/2020	12/08/2020	Sim
Ponto 32	Rio Doce	Baixo Guandu, ES	24k 0288311 7841895	16/02/2020	14/08/2020	Sim
Ponto 33	Rio Manhuaçu	Aimorés, MG	24k 0270455 7843334	17/02/2020	15/08/2020	Não
Ponto 34	Rio Manhuaçu	Aimorés, MG	24k 0261172 7842938	18/02/2020	10/09/2020	Não
Ponto 35	Rio Guandu	Baixo Guandu, ES	24k 0288291 7828762	28/02/2020	13/08/2020	Não
Ponto 36	Rio Doce	Colatina, ES	24k 0327949	29/02/2020	03/09/2020	Sim

Código do ponto	Nome da drenagem	Localidade	Coordenadas	Data coleta (chuvoso)	Data coleta (seco)	Área afetada
			7838898			

As análises genéticas foram realizadas em DNA genômico, extraído das amostras pelo método de CTAB 2% (DOYLE, 1991). Para cada amostra foram amplificados, via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), dez loci de microssatélites, utilizando *primers* específicos para cada espécie (RRDM, 2022). Posteriormente, os produtos da amplificação de cada microssatélite foram misturados formando um pool para cada indivíduo, os quais foram purificados com PEG a fim de eliminar fragmentos pequenos e restos de reagentes que podiam interferir os adaptadores na etapa seguinte. Na sequência, foram ligados os adaptadores contendo as sequências identificadoras de cada indivíduo. Em cada uma das extremidades dos fragmentos foram ligados dois tipos de adaptadores, o adaptador A e o adaptador P, respectivamente, de modo que o número de combinações de sequências identificadoras abrangesse o número de combinações possíveis entre os diferentes adaptadores, permitindo que cada indivíduo recebesse uma combinação única de sequência identificadora e limitando o número de indivíduos por chip às combinações possíveis dos *barcodes*.

Após a ligação dos adaptadores, os *pools* de microssatélites por indivíduo foram purificados novamente e misturados de forma equimolar para a formação das bibliotecas genômicas de cada espécie. Essas bibliotecas foram cortadas no Pippin Prep (Sage Science), a fim de selecionar fragmentos com tamanho ideal para processamento no sequenciador de Nova Geração (Next Generation Sequencing – NGS) ION TORRENT PGM. Por fim, um novo pool contendo todas as espécies, foi utilizado para compor a biblioteca genômica final. Esta biblioteca genômica foi aplicada no chip ION PGM 318 (Life Technologies), com capacidade de geração de aproximadamente 10 milhões de leituras (*reads*), permitindo a análise de microssatélites a partir de uma ou poucas genotipagens por sequenciamento (Genotype-by-Sequencing – GBS). As sequências resultantes foram separadas por indivíduo e por microssatélite, para análises posteriores.

Para cada locus de microssatélite, foram estimados os índices de diversidade genética: número de alelos, amplitude no tamanho dos alelos e heterozigosidade observada e esperada. O grau de polimorfismo de cada locus de microssatélite foi estimado, considerando todas as populações. Para cada população local (ponto de amostragem), foi estimado o número médio de alelos, amplitude média do tamanho dos alelos e a diversidade gênica.

A estrutura genético-populacional de cada espécie e entre as populações locais foi estimada utilizando a Análise de Variância Molecular (AMOVA) no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A AMOVA mede os níveis hierárquicos da distribuição da variabilidade genética e permite estimar os índices de endogamia totais (F_{IS} , F_{ST} e F_{IT}) (SEWALL WRIGHT, 1950) As estatísticas F foram calculadas em dois níveis, das subpopulações em relação ao total de populações (F_{ST}) e da média de variação de cada indivíduo em relação à cada subpopulação (F_{IS}). F_{IS} é também

chamado de coeficiente de endocruzamento e expressa a porção da variância que ocorre em cada indivíduo (portanto, altos valores deste parâmetro sugerem muito endocruzamento), enquanto que valores negativos indicam excesso de heterozigotos.

As medidas F_{ST} são também conhecidas como índice de fixação e podem ser interpretadas como a variância de alelos entre populações ou como a correlação entre dois alelos herdados do pai e da mãe (probabilidade de identidade por descendência) para cada indivíduo. Em condições de pequenas populações ou de autofecundação, o valor do F_{ST} é de 1 e em populações muito grandes e panmíticas (onde todos os indivíduos têm a mesma chance de cruzar com outros), é próximo a 0.

O F_{ST} é representado na seguinte fórmula:

$$F_{ST} = \frac{\sigma_S^2}{\sigma_T^2} = \frac{\sigma_S^2}{\bar{p}(1 - \bar{p})}$$

Onde \bar{p} representa a média da frequência de um alelo na população total, σ_S^2 é a variância da frequência do alelo nas diferentes subpopulações, ponderado pelo tamanho das subpopulações e σ_T^2 é o estado do alelo no total das populações (HOLSINGER; WEIR, 2009).

Os índices de endogamia foram estimados para cada população local, com o objetivo de detectar possíveis graus de ameaça de perda de variabilidade genética. Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram estimados para cada locus, utilizando o software Arlequin v. 3.5.

As estimativas de parâmetros genéticos também incluíram o parâmetro Garza-Williamson (G-W) (GARZA; WILLIAMSON, 2001). O índice G-W foi proposto por esses autores como uma relação média entre o número de alelos e o tamanho dos alelos numa dada amostra. Conforme os mesmos autores, este parâmetro permite distinguir entre reduções recentes do tamanho populacional e casos onde as populações mantiveram-se pequenas ao longo do tempo.

Conforme estudos de reamostragem em espécimes de táxons diferentes, o tamanho mínimo amostral de estudos de genética de populações para a obtenção de parâmetros estatísticos das frequências alélicas em cada locus (portanto, o nível de heterozigosidade esperada) deve ser de 25 a 30 espécimes (HALE et al., 2012). Esta exigência reduziu o número de espécies e de populações que pudessem ser analisadas neste estudo e em alguns casos, tamanhos amostrais menores foram utilizados para formar agrupamentos espaciais maiores (comparações entre as porções alta, média e baixa da bacia do Rio Doce) (Tabela 2). Foi realizado o contraste dos valores de F_{ST} par a par entre as localidades, para evidenciar estruturação populacional (revisado em KITADA et al., 2021).

Finalmente, os resultados dos padrões de variação dos microssatélites foram também analisados com a função discriminante de componentes principais DAPC (PRITCHARD et al., 2000; JOMBART et al., 2010; GRÜNWARD; GOSS, 2011) a qual permite a identificação e descrição de indivíduos geneticamente aparentados. Com o objetivo de representar os padrões espaciais e temporais de variação para toda a bacia, o DPAC incluiu os resultados obtidos nos anos 1, 2 e 3 do

PMBA (RRDM, 2018; RRDM, 2019; RRDM, 2020). O DPAC permite a representação gráfica de conjuntos de alelos e uma comparação direta da diferenciação de populações dentro da mesma espécie. Conforme Jombart et al. (2010), o PCA é uma ferramenta eficiente, mas não permite visualizar a caracterização da estrutura genética das populações biológicas nem a detecção de grupos que não tenham sido definidos *a priori*. A PCA tem como objetivo a variação geral dos indivíduos, tanto dentro de populações como dentro de cada população. Para trabalhar de forma mais eficiente a diferença entre as populações, os autores propõem a Análise Discriminante (DA) como uma forma de expressar as populações existentes numa dada amostra, de forma semelhante ao valor K do software Structure, reduzindo a variância dentro de uma mesma localidade e acentuando a variância entre as amostras, tornando assim, mais evidente a existência de agrupamentos diferenciados.

Nas espécies *Acará Geophagus brasiliensis*, *Curvina Pachyurus adspersus* e *Traíra Hoplias malabaricus*, as análises foram complementadas com a incorporação de dados do Baixo Rio Doce, obtidos durante os três anos de atividades do PMBA (RRDM, 2019; RRDM, 2020; RRDM, 2021).

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS GENÉTICOS

No Lambari-de-rabo-amarelo *Astyanax lacustris*, os resultados de seis amostras mostraram um número de alelos mínimo no Rio Manhuaçu, e uma sequência crescente de alelos nos afluentes Suaçuí e Santo Antônio. Já em termos de seções da calha, os valores foram menores no Médio Rio Doce, e aumentaram sequencialmente no Alto e Baixo Rio Doce. A amplitude do tamanho dos alelos foi maior no Baixo e no Alto Rio Doce. Por outro lado, a diversidade gênica (ou heterozigosidade esperada) foi mais alta na amostra do Santo Antônio. Para esta espécie, todos os parâmetros genéticos foram significativos, indicando alto grau de fixação (F_{IS}) dos espécimes dentro de cada amostra (a qual foi considerada nesta análise como subpopulação) e alto grau de fixação de cada subpopulação em relação ao total amostrado (F_{ST}). O índice G-W indicou que todas as amostras apresentam valores significativos, sugerindo algum tipo de gargalo genético (Tabela 3).

No *Acará Geophagus brasiliensis*, não foi possível coletar essa espécie no Médio Rio Doce e a análise foi restrita ao Alto e Baixo Rio Doce, além dos afluentes rios Manhuaçu e Piranga. Nesta espécie, o número e a amplitude do tamanho dos alelos foram mais altos no Baixo Rio Doce e ambos os afluentes apresentaram número relativamente baixo de alelos, sendo que a amplitude do tamanho dos alelos foi maior no Manhuaçu do que no Piranga. Porém, a diversidade gênica foi maior no Manhuaçu em relação às outras localidades (este padrão pode ser explicado porque neste rio, a

análise de barcode indica a presença de linhagens divergentes). Da mesma forma que para *A. lacustris*, os parâmetros genéticos F_{IS} , F_{ST} indicaram valores significativos e os resultados de G-W também sugerem gargalos populacionais (Tabela 3).

Na terceira espécie, a Curvina *Pachyurus adpersus*, não houve coletas na porção alta da calha do Rio Doce, sendo analisadas amostras das seções média e baixa do rio, além dos tributários Piranga e Santo Antônio. Nesta espécie, o número médio de alelos foi também maior no Baixo Rio Doce, um padrão que se mantém para todas as espécies. Os valores de números médios de alelos foram decrescendo na sequência: Médio Rio Doce, Piranga e Santo Antônio. A amplitude de variação dos tamanhos dos alelos seguiu em linhas gerais, os valores dos números de alelos. Já a diversidade gênica foi bem mais alta no Rio Piranga. Nesta espécie, apenas as subpopulações apresentaram-se significativamente divergentes da população geral (ou seja, de todas as amostras). Nesta espécie, os valores de variância alélica entre os indivíduos e suas populações (F_{IS}) não foram significativos, mas o valor de divergência entre as subpopulações com o total (F_{ST}) foi significativo. Novamente, o índice G-W foi significativo tanto no médio quanto no baixo Rio Doce. Porém, o índice G-W indicou que todas as amostras apresentam algum tipo de gargalo (Tabela 3).

A quarta espécie, a Traíra *Hoplias malabaricus* foi amostrada nas três seções da calha do Rio Doce, mas as amostras do Alto e Médio Rio Doce foram relativamente pequenas ($N=10$) e os resultados devem ser considerados como preliminares. Nesta espécie, novamente o Baixo Rio Doce apresentou o maior número de alelos, seguido pelo Alto e pelo Médio Rio Doce. A amplitude do tamanho dos alelos e a diversidade gênica também foram superiores no Baixo Rio Doce. Novamente, e seguindo o padrão das primeiras duas espécies, todos os parâmetros genéticos indicam efeitos de gargalo nas três seções da bacia (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Tabela 2: Espécies, tamanhos amostrais, locais, seções da bacia, condições de impacto e identificação dos pontos na malha amostral dos espécimes analisados com a técnica de microssatélites. Quando necessário, dados de *G. brasiliensis*, *Hoplias malabaricus* e *P. adspersus* coletados no PMBA foram utilizados para fins comparativos.

Espécie	N	Referência	Local de coleta	Situação	Ponto amostral
<i>Astyanax lacustris</i>	8	Rio Gualaxo do Norte em Paracatu de Baixo - MG	Alto rio Doce	afetado	Ponto 03
<i>Astyanax lacustris</i>	1	Governador Valadares	Médio rio Doce	afetado	Ponto 28
<i>Astyanax lacustris</i>	11	São José do Goiabal	Alto rio Doce	afetado	Ponto 13
<i>Astyanax lacustris</i>	6	Rio Santo Antônio em Sto Antônio do Rio Abaixo - MG	Tributário - Sto Antônio	não afetado	Ponto 11
<i>Astyanax lacustris</i>	5	Rio Doce em Naque - MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 09
<i>Astyanax lacustris</i>	5	Rio Doce em Aimorés - MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 31
<i>Astyanax lacustris</i>	6	Rio Doce em Aimorés - MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 23
<i>Astyanax lacustris</i>	10	Rio Doce em Tumiritinga MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 21
<i>Astyanax lacustris</i>	7	Rio Doce em Colatina - ES	Baixo rio Doce	afetado	Ponto 36
<i>Astyanax lacustris</i>	22	Rio Manhuaçu em Aimorés - MG	Tributário - Manhuaçu	não afetado	Ponto 34
<i>Astyanax lacustris</i>	13	Rio Manhuaçu em Aimorés - MG	Tributário - Manhuaçu	não afetado	Ponto 33

Espécie	N	Referência	Local de coleta	Situação	Ponto amostral
<i>Astyanax lacustris</i>	5	Rio Doce em Ponte Queimada, PERD - MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 02
<i>Astyanax lacustris</i>	16	Rio Doce - Baixo Guandu	Baixo rio Doce	afetado	Ponto 32
<i>Astyanax lacustris</i>	5	Rio Doce em Conselheiro Pena - MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 27
<i>Astyanax lacustris</i>	21	Rio Suaçui Grande em Matias Lobato - MG	Tributário - Suaçuí	não afetado	Ponto 29
<i>Astyanax lacustris</i>	9	Rio Suaçui em Mathias Lobato	Tributário - Suaçuí	não afetado	Ponto 30
<i>Astyanax lacustris</i>	18	Rio Santo Antônio em Naque - MG	Tributário - Sto Antônio	não afetado	Ponto 25
<i>Astyanax lacustris</i>	2	Rio Doce - Linhares ES	Baixo rio Doce	afetado	Ponto 37
<i>Astyanax lacustris</i>	1	Rio Doce - Linhares/Povoação ES	Baixo rio Doce	Afetado	Ponto 39
<i>Astyanax lacustris</i>	9	Rio Doce em Candonga - MG	Alto rio Doce	afetado	Ponto 10
<i>Astyanax lacustris</i>	2	Rio Doce Jusante da UHE Candonga	Alto rio Doce	afetado	Ponto 08
<i>Astyanax lacustris</i>	4	Rio Carmo - MG	Alto rio Doce	afetado	Ponto 15
<i>Astyanax lacustris</i>	4	Foz Rio do Carmo com Piranga	Alto rio Doce	afetado	Ponto 07

Espécie	N	Referência	Local de coleta	Situação	Ponto amostral
<i>Astyanax lacustris</i>	3	Rio Santo Antônio em Santo Antônio da Fortaleza - MG	Tributário - Sto Antônio	não afetado	Ponto 14
<i>Astyanax lacustris</i>	4	Rio Santo Antônio Jusante Rio Tanque Ferros - MG	Tributário - Sto Antônio	não afetado	Ponto 12
<i>Astyanax lacustris</i>	5	Povoação - Foz do Doce	Baixo rio Doce	afetado	Ponto 40
<i>Astyanax lacustris</i>	1	Rio Doce em Resplendor - MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 26
Total <i>Astyanax lacustris</i>	203				
<i>Geophagus brasiliensis</i>	8	Rio Doce em Candonga - MG	Alto rio Doce	afetado	Ponto 10
<i>Geophagus brasiliensis</i>	5	Rio Piranga à montante da foz com Rio do Carmo – MG	Tributário - Piranga	não afetado	Ponto 06
<i>Geophagus brasiliensis</i>	12	Rio Piranga Jusante UHE Brito - MG	Tributário - Piranga	não afetado	Ponto 16
<i>Geophagus brasiliensis</i>	18	Rio Doce em Guaraciaba – MG	Tributário - Piranga	não afetado	Ponto 05
<i>Geophagus brasiliensis</i>	1	São José do Goiabal	Alto rio Doce	afetado	Ponto 13
<i>Geophagus brasiliensis</i>	15	Rio Manhuaçu em Aimorés – MG	Tributário - Manhuaçu	não afetado	Ponto 34
<i>Geophagus brasiliensis</i>	9	Rio Manhuaçu em Aimorés – MG	Tributário - Manhuaçu	não afetado	Ponto 33

Espécie	N	Referência	Local de coleta	Situação	Ponto amostral
<i>Geophagus brasiliensis</i>	7	Rio Carmo – MG	Alto rio Doce	afetado	Ponto 15
<i>Geophagus brasiliensis</i>	6	Rio Do Carmo em Barra Longa - MG	Alto rio Doce	afetado	Ponto 04
<i>Geophagus brasiliensis</i>	6	Foz Rio do Carmo com Piranga	Alto rio Doce	afetado	Ponto 07
<i>Geophagus brasiliensis</i>	2	Rio Doce Jusante da UHE Candonga	Alto rio Doce	afetado	Ponto 08
<i>Geophagus brasiliensis</i>	3	Rio Gualaxo do Norte em Paracatu de Baixo - MG	Alto rio Doce	afetado	Ponto 03
Total <i>Geophagus brasiliensis</i>	92				
<i>Hoplias malabaricus</i>	9	Rio Doce em Candonga – MG	Alto rio Doce	afetado	Ponto 10
<i>Hoplias malabaricus</i>	2	Rio Gualaxo do Norte em Paracatu de Baixo - MG	Alto rio Doce	afetado	Ponto 03
<i>Hoplias malabaricus</i>	14	Rio Doce em Aimorés – MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 23
<i>Hoplias malabaricus</i>	3	Rio Doce em Aimorés – MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 31
<i>Hoplias malabaricus</i>	5	Rio Doce em Resplendor – MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 26
<i>Hoplias malabaricus</i>	5	Foz Rio do Carmo com Piranga	Alto rio Doce	afetado	Ponto 07

Espécie	N	Referência	Local de coleta	Situação	Ponto amostral
<i>Hoplias malabaricus</i>	1	Rio Doce Jusante da UHE Candonga	Alto rio Doce	afetado	Ponto 08
<i>Hoplias malabaricus</i>	1	Rio Doce em Gov. Valadares - MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 28
Total <i>Hoplias malabaricus</i>	40				
<i>Pachyurus adspersus</i>	7	Rio Piranga Jusante UHE Brito - MG	Tributário - Piranga	não afetado	Ponto 16
<i>Pachyurus adspersus</i>	19	Rio Doce em Guaraciaba – MG	Tributário - Piranga	não afetado	Ponto 05
<i>Pachyurus adspersus</i>	14	Rio Santo Antônio em Sto Antônio do Rio Abaixo - MG	Tributário - Sto Antônio	não afetado	Ponto 11
<i>Pachyurus adspersus</i>	1	Rio Doce em Tumiritinga MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 21
<i>Pachyurus adspersus</i>	2	Rio Doce em Colatina – ES	Baixo rio Doce	afetado	Ponto 36
<i>Pachyurus adspersus</i>	21	rio Doce - Baixo Guandu	Baixo rio Doce	afetado	Ponto 32
<i>Pachyurus adspersus</i>	20	Rio Doce em Resplendor – MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 26
<i>Pachyurus adspersus</i>	2	Rio Doce em Naque – MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 09
<i>Pachyurus adspersus</i>	17	Rio Doce em Aimorés – MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 31

Espécie	N	Referência	Local de coleta	Situação	Ponto amostral
<i>Pachyurus adspersus</i>	5	Rio Doce em Conselheiro Pena - MG	Médio rio Doce	afetado	Ponto 27
<i>Pachyurus adspersus</i>	1	Rio Doce - Linhares/Povoação ES	Baixo rio Doce	Afetado	Ponto 39
<i>Pachyurus adspersus</i>	4	Rio Santo Antônio Jusante Rio Tanque Ferros - MG	Tributário - Sto Antônio	não afetado	Ponto 12
<i>Pachyurus adspersus</i>	4	Rio Santo Antônio em Santo Antônio da Fortaleza - MG	Tributário - Sto Antônio	não afetado	Ponto 14
<i>Pachyurus adspersus</i>	4	Rio Doce - Baixo Guandu	Baixo rio Doce	afetado	Ponto 01 -RRDM
<i>Pachyurus adspersus</i>	1	Rio Doce - Fazenda Três Marias	Baixo rio Doce	afetado	Ponto 03 - RRDM
<i>Pachyurus adspersus</i>	2	Rio Doce – próximo à Lagoa do Óleo	Baixo rio Doce	afetado	Ponto 02 - RRDM
Total <i>Pachyurus adspersus</i>	124				

Tabela 3: Resultados dos parâmetros genéticos obtidos em quatro espécies da bacia do Rio Doce. N = tamanho da amostra, F_{ST} , F_{IS} e G-W são índices que estimam o grau de endocruzamento dos indivíduos e das populações. Valores em negrito indicam valor significativo a 5%. As espécies e seus parâmetros estão identificados por cores.

Espécie	Estações de coleta	N	No médio de alelos (\pm SD)	Amplitude tamanho dos alelos	Diversidade gênica (\pm SD)*	F _{ST}	F _{IS}	G-W Index (S.D.)
<i>Astyanax lacustris</i>	Alto Rio Doce	21	9,87 (3,90)	22,12 (11,70)	0,793 (0,450)	0,041	0,336	0,465 (0,131)
	Baixo Rio Doce	50	12,25 (5,89)	25,50 (11,23)	0,711 (0,380)			0,484 (0,215)
	Rio Manhuaçu	10	5,12 (2,53)	18,00 (13,41)	0,692 (0,411)			0,372 (0,197)
	Médio Rio Doce	17	7,25 (4,26)	18,50 (14,64)	0,534 (0,506)			0,479 (0,248)
	Rio Santo Antônio	18	8,62 (2,97)	20,50 (12,69)	0,801 (0,540)			0,458 (0,128)
	Rio Suaçui	20	6,50 (4,10)	21,37 (15,98)	0,371 (0,312)			0,367 (0,216)
<i>Geophagus brasiliensis</i>	Alto Rio Doce	30	8,00 (4,00)	15,00 (8,12)	0,537 (0,357)	0,244	0,044	0,526 (0,168)
	Baixo Rio Doce	50	11,57 (6,10)	16,42 (7,32)	0,684 (0,373)			0,646 (0,127)
	Rio Manhuaçu	12	5,85 (2,91)	15,14 (9,94)	0,694 (0,448)			0,421 (0,193)
	Rio Piranga	28	5,85 (2,79)	11,71 (8,11)	0,588 (0,361)			0,525 (0,210)

Espécie	Estações de coleta	N	No médio de alelos (±SD)	Amplitude tamanho dos alelos	Diversidade gênica (±SD)*	FST	FIS	G-W Index (S.D.)
<i>Pachyurus adspersus</i>	Baixo Rio Doce	50	6,00 (2,23)	7,14 (4,45)	0,530 (0,293)	0,211	-	0,818 (0,196)
	Médio Rio Doce	26	5,50 (2,07)	6,66 (3,07)	0,413 (0,274)			0,730 (0,150)
	Rio Piranga	5	4,28 (1,49)	6,28 (2,69)	0,733 (0,447)			0,604 (0,096)
	Rio Santo Antônio	8	3,28 (1,11)	4,42 (2,50)	0,572 (0,371)			0,662 (0,188)
<i>Hoplias malabaricus</i>	Alto Rio Doce	10	3,85 (1,34)	3,85 (1,95)	0,532 (0,345)	0,148	0,087	0,821 (0,131)
	Médio Rio Doce	10	3,50 (1,41)	4,75 (2,37)	0,524 (0,326)			0,660 (0,262)
	Baixo Rio Doce	31	5,50 (2,20)	7,00 (3,33)	0,612 (0,348)			0,730 (0,192)

Os valores p de significância de F_{ST} foram contrastados em comparações pareadas de cada local, para identificar o grau de divergência entre as localidades (ou seja, a estruturação das populações). No caso do Lambari *Astyanax lacustris* (Tabela 4), todos os valores foram significativos, exceto entre as amostras do Baixo Rio Doce e o Rio Manhuaçu, entre os rios Manhuaçu e Santo Antônio e entre o Médio Rio Doce e o Rio Santo Antônio. Estes valores não significativos sugerem maior intercâmbio genético entre essas localidades, ou seja, a ausência de estrutura populacional diferenciada entre as localidades.

Os valores do F_{ST} para o Acará *G. brasiliensis* e para a Traíra *H. malabaricus* foram significativos entre todas as localidades (Tabela 5 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e Tabela 6 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, respectivamente). O padrão obtido para a Curvina *Pachyurus adspersus* mostra um padrão bastante curioso, onde apenas a comparação entre o Médio e Baixo Rio Doce não foi significativo (Tabela 7). Dados obtidos com o DNA barcode (RRDM 2019) indicam dois grupos bem definidos, um que ocorre no Alto Rio Doce e outro, no restante da bacia. Os dados de microssatélites permitem demonstrar uma subdivisão ainda maior entre a calha e alguns dos tributários.

Tabela 4: Valores p das comparações pareadas das populações do Lambari *Astyanax lacustris* analisadas com microssatélites da bacia do Rio Doce. Localidades: 1 - Alto Rio Doce; 2 – Baixo Rio Doce; 3 – Rio Manhuaçu; 4 – Médio Rio Doce; 5 – Rio Santo Antônio; 6 – Rio Suaçuí. Valores em negrito são significativos ao nível de 0,05.

	1	2	3	4	5	6
1	*					
2	0.00000+-0.0000	*				
3	0.00010+-0.0001	0.17840+- 0.0037	*			
4	0.00188+-0.0004	0.00634+- 0.0007	0.00426+- 0.0007	*		
5	0.00723+-0.0008	0.00426+- 0.0007	0.25869+- 0.0040	0.08494+- 0.0026	*	
6	0.00000+-0.0000	0.03544+- 0.0019	0.00465+- 0.0007	0.03128+- 0.0019	0.01584+- 0.0014	*

Tabela 5: Valores p das comparações pareadas das populações do Acará *Geophagus brasiliensis* analisadas com microsatélites da bacia do Rio Doce. Localidades: 1 - Alto Rio Doce; 2 – Baixo Rio Doce; 3 – Rio Manhuaçu; 4 – Piranga. Valores em negrito são significativos ao nível de 0,05.

	1	2	3	4
1	*			
2	0.00000+-0.0000	*		
3	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	*	
4	0.00109+-0.0003	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	*

Tabela 6: Valores p das comparações pareadas das populações da Traíra *Hoplias malabaricus*, analisadas com microsatélites da bacia do Rio Doce. Localidades: 1 - Alto Rio Doce; 2 – Baixo Rio Doce; 3 – Médio Rio Doce. Valores em negrito são significativos ao nível de 0,05.

	1	2	3
1	*		
2	0.00040+-0.0002	*	
3	0.00663+-0.0009	0.00000+-0.0000	*

Tabela 7: Valores p das comparações pareadas das populações da Curvina *Pachyurus adpersus* analisadas com microssatélites da bacia do Rio Doce. Localidades: 1 - Baixo Rio Doce; 2 – Médio Rio Doce; 3 – Rio Piranga; 4 –Rio Santo Antônio. Valores em negrito são significativos ao nível de 0,05.

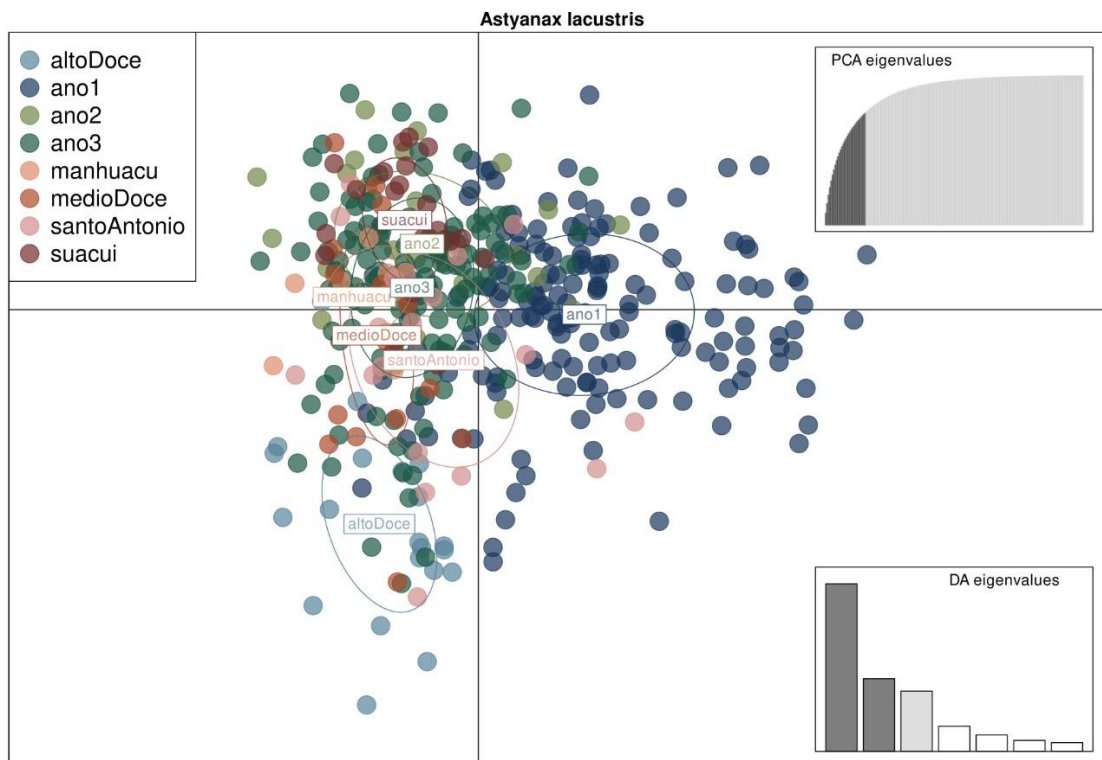
	1	2	3	4
1	*			
2	0.12108+-0.0035	*		
3	0.00000+-0.0000	0.00010+-0.0001	*	
4	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.04554+-0.0023	*

4.2 ANÁLISE DAPC

Posteriormente, foi realizada uma Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC), para todas as quatro espécies para visualizar o grau de diversidade dos microssatélites, incorporando para cada espécie, todos os resultados obtidos pelo PMBA no Baixo Rio Doce (Figura 6, Figura 7, Figura 8 e Figura 9).

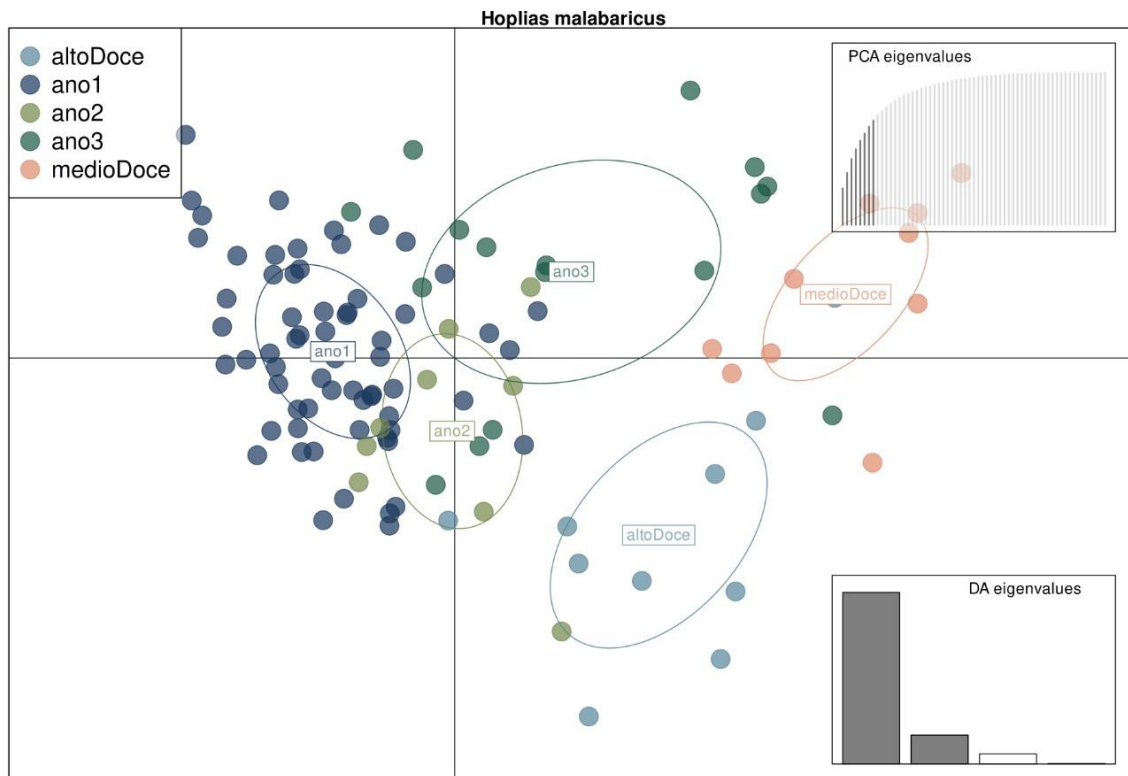
No caso do Lambari *Astyanax lacustris*, observou-se uma tendência de agrupamento das amostras, à esquerda no gráfico (Figura 6). Em geral, os dados aparecem agrupados sem demonstrar grandes espaços dentro da bacia, consolidando a ideia de ser uma espécie com um grau relativamente maior de panmixia (cruzamento aleatório entre os indivíduos) de todas as amostras da bacia. Essa homogeneidade pode ser explicada porque há um grande fluxo gênico entre as populações ou porque esta espécie apresenta grandes populações que têm menor chance de perda ao acaso de alelos.

Figura 6: Análise Discriminante de Componentes Principais das variações de microssatélites obtidas em populações do Lambari-de-rabo amarelo *Astyanax lacustris*.



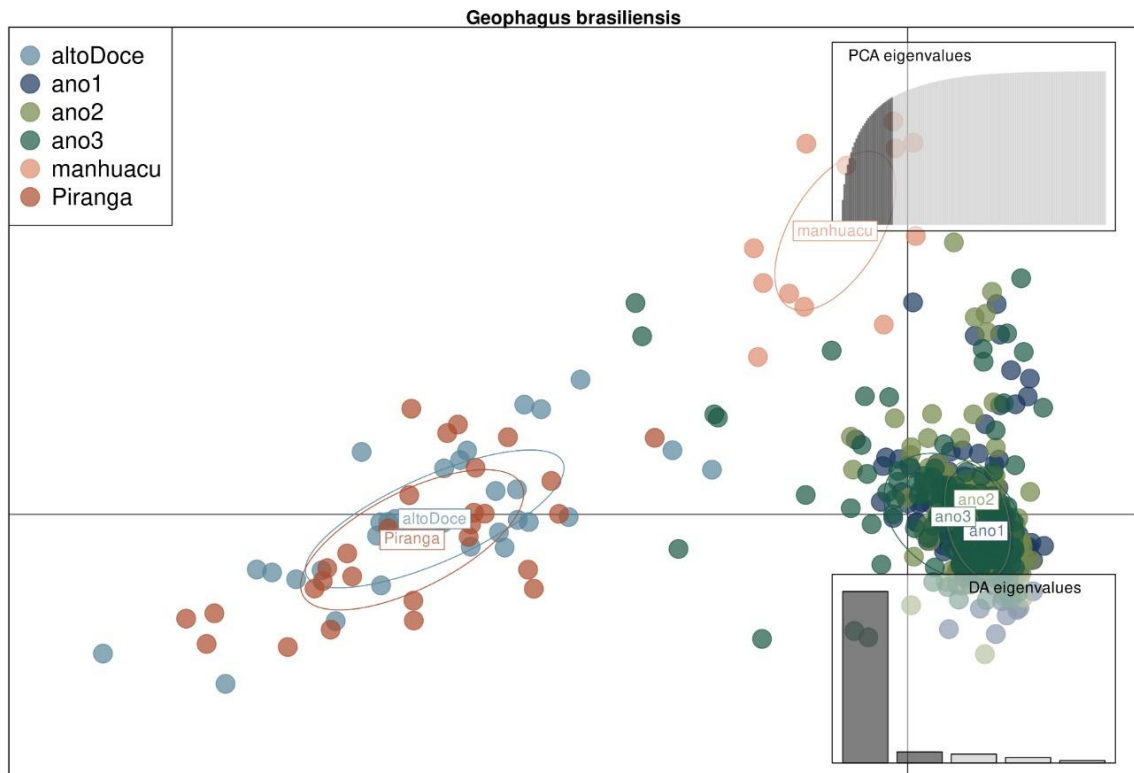
No caso do DAPC da Traíra *Hoplias malabaricus*, observa-se uma variação evidente das frequências alélicas entre os anos 1, 2 e 3 (Figura 7), todas elas coletadas nos três anos de atividades do PMBA (RRDM, 2019; RRDM, 2020 e RRDM, 2021). As amostras do Baixo Rio Doce são também diferenciadas das obtidas nas populações do Alto e Médio Rio Doce.

Figura 7: Análise Discriminante de Componentes Principais das variações de microssatélites obtidas em populações de Traíra *Hoplias malabaricus*. O Baixo Rio Doce está representado pelos nomes ano 1, ano 2 e ano 3 e são resultados dos 3 anos de atividades do PMBA.



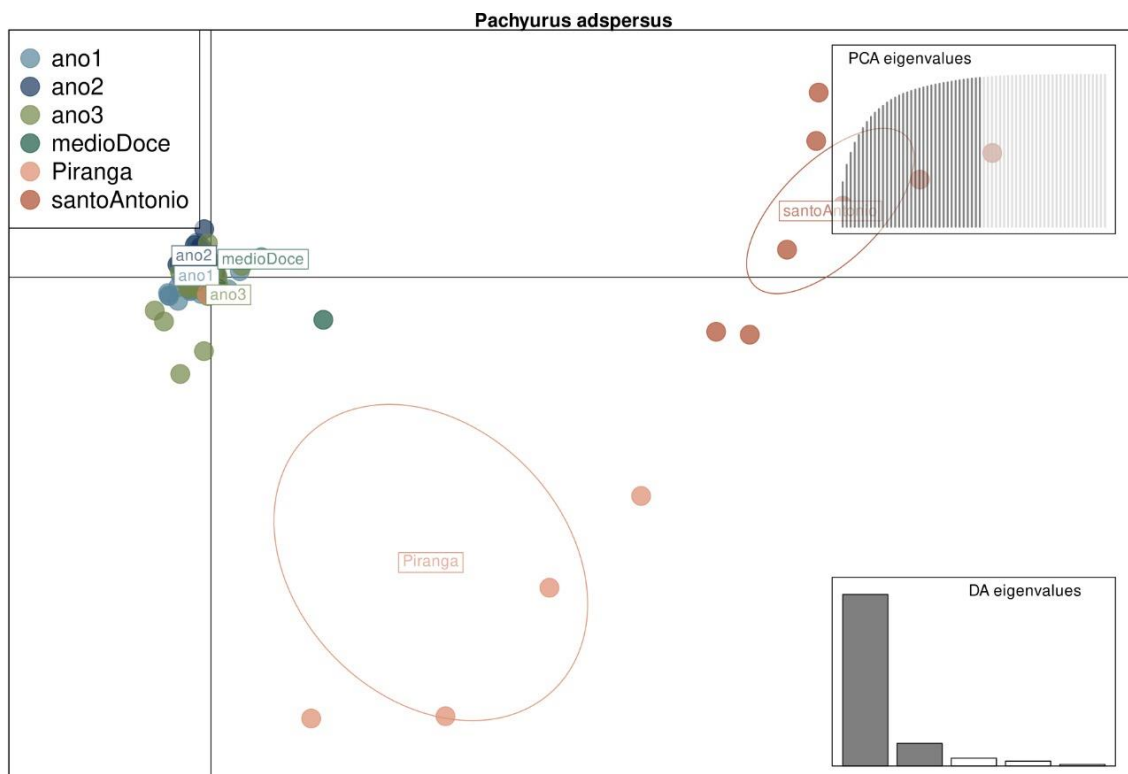
Na análise de DAPC do Acará *Geophagus brasiliensis*, o grau de dispersão dos conjuntos de frequências alélicas é ainda maior, caracterizando visualmente três grupos: um formado pelas amostras do Baixo Rio Doce, um segundo coletado no Rio Manhuaçu e ainda um terceiro, formado por amostras do Alto Rio Doce e do Rio Piranga (Figura 8). Este padrão está em concordância com os padrões obtidos pelo DNA barcode (de natureza mitocondrial) (UFV, 2022) e, porque os microssatélites são de natureza nuclear, corrobora a existência de linhagens crípticas dentro deste táxon formal (espécies que são diferentes mas apresentam morfologia semelhante). De fato, desde o ano 1 do PMBA (RRDM 2019), os dados de barcode demonstram que as populações de *Geophagus brasiliensis* representam linhagens com alto grau de divergência molecular, o qual sugere a ocorrência de três linhagens de *Geophagus brasiliensis* dentro da bacia (Tabela 8 do Anexo 1).

Figura 8: Análise Discriminante de Componentes Principais das variações de microssatélites obtidas em populações de Acará *Geophagus brasiliensis*.



O DAPC da Curvina *Pachyurus adpersus* demonstra um padrão ainda mais extremo que o observado no Acará. A Curvina apresenta três grupos na bacia: um grupo bem homogêneo que aparece com os nomes ano 1, ano 2 e ano 3, localizados no Baixo Rio Doce e que correspondem aos dados coletados pelo PMBA nos três anos de atividades) e dois grupos distribuídos no Rio Piranga (tributário do Alto Rio Doce) e no Rio Santo Antônio, no Médio Rio Doce (Figura 9).

Figura 9: Análise Discriminante de Componentes Principais das variações de microssatélites obtidas em populações da Curvina *Pachyurus adspersus*



5 DISCUSSÃO

Os dados obtidos com microssatélites mostram um padrão geral de estruturação das populações ao longo da calha e dos tributários em relação à calha. Sob uma perspectiva de metapopulações, a aparente predominância de processos de deriva genética pode ser interpretada como o resultado de extinção e de substituição de metapopulações de cada espécie. É digno de menção o fato que o índice G-W ter sido significativo em todos os casos e para todas as amostras. Esse resultado foi também obtido para as seis espécies que foram analisadas no Baixo Rio Doce (RRDM, 2019; RRDM, 2020; RRDM, 2021). Em termos genéticos, esse padrão poderia ser explicado pelo Efeito Wahlund (WAHLUND, 1928), o qual aponta para deficiência de heterozigotos, quando há barreiras geográficas ou ecológicas que impedem o fluxo gênico entre as populações e um aumento da deriva genética dentro das populações isoladas, mesmo que o conjunto de todas as populações na bacia se encontre em equilíbrio Hardy-Weinberg (sem mudanças na frequência de alelos e no genótipo das populações).

Das quatro espécies analisadas, em três delas a existência de possíveis espécies crípticas pode alterar os resultados dos parâmetros estatísticos genéticos. Porém, a Curvina *P. adspersus* é a única espécie que não apresenta variação de COI , e mesmo assim, ela também apresenta altos valores de F_{ST} entre o Alto Rio Doce e os tributários rios Piranga e Santo Antônio. Os efeitos da perda da

diversidade genética são graves e foram expressos por Fisher (1941) como a Teoria Fundamental da Seleção Natural. Nas suas palavras “The rate of increase in the average fitness of a population is equal to the genetic variance of fitness of that population” o qual pode ser traduzido como “a taxa de aumento da adaptação média de uma população é igual à variância genética de adaptabilidade dessa população”. Ou seja, quando a variabilidade genética cai, os organismos têm menor capacidade adaptativa para reagir a mudanças ambientais.

Parte dos fatores causais dessa condição pode ser de natureza pretérita ao desastre da barragem de Fundão. Fatores que certamente contribuem para o declínio das espécies são a degradação de habitat, efeito de espécies introduzidas e perda de conectividade provocada por barragens (DUDGEON et al., 2006). De fato, estudos com microssatélites têm demonstrado o efeito deletério das barragens na variação genética de duas espécies de pintado migratórias e de grande porte (*Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*) (DO PRADO et al., 2017).

Mas recentemente, porém, o distúrbio provocado pela passagem de rejeito de minério agravou este cenário, conforme evidenciado pelas mudanças nos isótopos estáveis na espécie de lambari *Knodus moenkhausii* e pelas alterações na composição das dietas de várias espécies em locais afetados e não afetados pelo rejeito (como a ausência de insetos aquáticos nos locais afetados e a redução de espécies nativas predadoras nesses locais) (CARVALHO et al., 2022). As condições mais preocupantes são aquelas espécies que já apresentavam linhagens mais restritas (como o acará e a curvina) e relativamente menos preocupantes as espécies como o lambari, o qual apresenta uma maior homogeneidade molecular na bacia.

Os resultados podem ser interpretados no contexto das ameaças aos ecossistemas propostas pela IUCN no seu capítulo da Lista vermelha dos ecossistemas (BLAND et al., 2016). Sob essa perspectiva, as populações de peixes da bacia do Rio Doce podem ser inseridas dentro do modelo conceitual de causa e efeito, no qual são consideradas as ameaças derivadas da degradação do ambiente abiótico (com fatores que agem de longa data na bacia, como assoreamento, poluição, barragens e destruição da mata ciliar e, mais recentemente, o desastre da passagem do rejeito de minério) e alterações do ambiente biótico. No caso do ambiente biótico, as relações bióticas alteradas ainda não foram estudadas, mas certamente envolvem a relação entre as espécies nativas com as não-nativas. Aliás, as espécies não-nativas como os tucunarés e a piranha-vermelha presentes na bacia do Rio Doce, já demonstraram seu enorme impacto na comunidade de espécies nativas, mesmo na ausência de alterações abióticas (FRAGOSO-MOURA et al., 2016).

A matriz biológica pretérita ao impacto da passagem do rejeito de minério incluía a ocorrência de linhagens derivadas de outras bacias, com a distribuição restrita de algumas populações ou espécies. As espécies de distribuição restrita ou intolerantes às mudanças ambientais estão em pleno declínio na bacia e continuam sendo coletadas de forma eventual e rara nos levantamentos de campo. Assim, elas dificilmente são alvo de estudos como os realizados neste projeto. Mesmo considerando as quatro espécies estudadas, o acará parece estar em declínio na calha do Médio Rio Doce e por esse motivo, amostras dessa região não foram inclusas neste estudo. É provável que esta espécie seja

uma das que mais rapidamente desaparecem nos ambientes invadidos pela piranha-vermelha e pelos tucunarés, conforme observado nas lagoas do Médio Rio Doce (FRAGOSO-MOURA, 2016; Dergam, obs. pess.).

É possível estabelecer um ranqueamento dos trechos do Rio Doce e de seus tributários? Os valores de p do coeficiente de F_{ST} indicam que cada espécie é um caso diferente. No extremo de compartimentação genética, o Acará aparece como formado por linhagens diferenciadas que podem estar representando gargalos mais críticos que as outras espécies. Nesse sentido, também a Curvina apresenta duas populações bem definidas, uma ocupando o Alto Rio Doce e a outra, no Médio e Baixo Rio Doce. A Traíra se destaca por ser extremamente sedentária e por isso, propensa a mostrar o grau máximo de diferenciação entre os locais (ela junto ao Acará mostrou níveis máximos de diferenciação do parâmetro F_{ST}) e essa diferenciação aparece de forma bem evidente ao longo da calha do Rio Doce (Figura 3). Sob a perspectiva dos afluentes, eles também representam ranqueamentos específicos para cada caso: o Rio Piranga parece ser o habitat de uma população altamente divergente de Curvina, enquanto que o Rio Manhuaçu é o local de maior proximidade genética com o Baixo Rio Doce, assim como um local onde há linhagem diferenciada de Acará. O Rio Santo Antônio apresenta proximidade com o Médio Rio Doce nas suas populações de Lambari. Junto a todos esses padrões, é importante lembrar que esses três rios também alojam populações relictuais da espécie criticamente ameaçada Surubim do Rio Doce *Steindachneridion doceanum* (ICMBIO, 2018) acrescentando assim ainda mais, as suas relevâncias na proteção da ictiofauna.

Considerando todos esses fatores, as medidas necessárias para proteger e acelerar o processo de repovoamento da comunidade nativa e característica do Rio Doce envolve: a proteção dos rios tributários, o controle de espécies exóticas ou introduzidas e a recomposição do grau de conectividade entre as populações das espécies aqui analisadas.

6 CONCLUSÕES

Os dados genéticos obtidos com microssatélites são concordantes com dados de DNA barcode e mostram que as quatro espécies analisadas apresentam perda de diversidade genética ao longo da calha e entre a calha e os tributários. Este padrão pode ser explicado como resultado dos processos de fragmentação de habitat e perda de conectividade das diferentes seções do rio, além do provável efeito de diminuição populacional por concorrência com espécies introduzidas na bacia. Vários fatores causaram a degradação e perda ambiental da bacia e podem ter determinado a extinção de populações (refletida nos parâmetros genéticos conforme revisado por Ovaskainen e Saastamoinen, 2018). Esses fatores históricos prévios ao desastre ambiental da barragem de Fundão podem ter sido acentuados com a recente passagem do rejeito de minério na calha do Rio Doce.

Em relação aos objetivos propostos, os resultados permitiram:

- 1) **Avaliar temporalmente a variabilidade e estruturação genética das populações de peixes dos tributários e da calha principal da bacia do Rio Doce.** A avaliação temporal

ficou restrita ao esforço realizado nas duas campanhas realizadas em 2020, cinco anos após a passagem do rejeito de minério. As espécies estudadas foram aquelas de ampla distribuição na bacia e com um número amostral mínimo de 25 a 30. Nelas, observa-se uma redução na variabilidade genética e um alto grau de estruturação ao longo da calha do Rio Doce, assim como entre a calha e seus tributários.

- 2) **Ampliar o conhecimento sobre a diversidade e a distribuição da ictiofauna da bacia do Rio Doce.** As restrições ao número de espécies e aos tamanhos amostrais mínimos prejudicaram uma avaliação mais abrangente da ictiofauna como um todo. Porém, as espécies que foram selecionadas para este estudo estão entre as mais tolerantes da bacia do Rio Doce. É evidente que todas as amostras apresentam um alto grau de endocruzamento, sugerindo um alto grau de perda de interconectividade em toda a bacia. A recuperação da conectividade na bacia é uma das condições essenciais para a proteção da biodiversidade nativa e característica da bacia.
- 3) **Produzir um ranking da importância ecológica e conservacionista de cada tributário baseado na contribuição potencial ou real do seu aporte de peixes para a calha principal.** Os resultados indicam que os rios Piranga, Santo Antônio e Manhuaçu são de alta relevância para todas as espécies aqui analisadas.
- 4) **Investigar a conectividade (fluxo gênico entre as populações de espécies de peixes) entre os tributários e a calha principal do Rio Doce.** O fluxo gênico foi avaliado conforme o grau de estruturação populacional de cada espécie. Os parâmetros genéticos indicaram que o fluxo gênico está, em geral, comprometido em toda a bacia, para todas as espécies analisadas. Porém, alguns casos específicos demonstram ausência de estruturação entre alguns tributários com a calha ou em trechos da calha, como no Lambari *Astyanax lacustris* e na Curvina *Pachyurus adspersus*.
- 5) **Produzir um estudo da história evolutiva recente da ictiofauna da bacia do Rio Doce.** Este estudo é o mais abrangente sob o ponto de vista genético em termos de números de espécies e alcance espacial de cada espécie. Por ser o primeiro desse tipo, representa o marco-zero dos acontecimentos que já estavam presentes na bacia e que podem ter sido aprofundados pela passagem do rejeito de minério. Nesse sentido, os padrões observados que demonstram a redução do fluxo gênico em todos os níveis, podem direcionar as políticas de acelerar o processo de recuperação da ictiofauna da bacia do Rio Doce.

7 BIBLIOGRAFIA

- BARBOSA, A. C. D. R. et al. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 3, p. 936-938, 2006.
- BARBOSA, A. C. D. R. et al. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. **Genetics and Molecular Biology** v. 31, sup 1, p. 357–360, 2008.
- BLAND, L.M. et al. **Guidelines for the application of IUCN Red List of Ecosystems Categories and Criteria**, Version 1.0. Gland, Switzerland: IUCN. ix + 94pp, 2016.
- BROOKER, A. L. et al. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 51, n. 9, p. 1959-1966, 1994.
- BROWN, J.H.; KODRIC-BROWN A. Turnover rates in insular biogeography: effect of immigration on extinction. **Ecology** v.58, p. 445– 449, 1977.
- CARVALHO, D. R.; POMPEU, P.S. Avaliação dos efeitos da presença de poluentes sobre a ecologia trófica da ictiofauna da bacia do Rio Doce. **Relatório do Subprojeto II. Acordo de Cooperação Técnica UFV- Fundação Renova**. 2022
- CUNHA et al. Phylogeography and historical biogeography of the *Astyanax bimaculatus* species complex in coastal Southeastern South America. **Zebrafish** V. 15, n. 1 p. 115-127, 2019.
- CHAVES, B. R. N.; AMARANTE, M. C.; NACIF, W. F. **Relatório Técnico DEAMB/SEMAD/SISEMA Nº 011/2016. Mortandade de peixes na Bacia do Rio Doce após rompimento da barragem da Samarco no distrito de Bento Rodrigues (Mariana/MG), em 05/11/2015**, p. 1-71, 2016.
- DO PRADO et al. Genetic structure and evidence of anthropogenic effects on wild populations of two Neotropical fishes: baselines for conservation. **Journal of Fish Biology**. 92, p.55-72, 2017
- DOYLE, J. DNA Protocols for Plants. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., Young, J.P.W. (eds) **Molecular Techniques in Taxonomy**. NATO ASI Series, vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg, 1991.
- DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 163-182, 2006.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** v. 10, n 3, p. 564-567, 2010.
- FERREIRA, D. G. et al. Development and characterization of 14 microsatellite loci in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). **Journal of Fish Biology** v.83, n 5, pp. 1430–1438, 2013.

FISHER, R.A. The asymptotic approach to Behrens's integral, with further tables for the test of significance. *Ann Eugenics* v.11, p. 141–172, 1941.

FRAGOSO-MOURA, E. N.; OPORTO, L. T.; MAIA-BARBOSA, P. M.; BARBOSA, F. A. R. Loss of biodiversity in a conservation unit of the Brazilian Atlantic Forest: the effect of introducing non-native fish species. *Brazilian Journal of Biology*, v. 76, p. 18-27, 2016.

GAGGIOTTI, O. E. et al. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology* v. 8, p 1513-1520, 1999.

GARZA, J.C.; WILLIAMSON E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* v. 10 p. 305–318, 2001.

GRAUR, D.; SATER, A. K.; COOPER, T. F. **Molecular and genome evolution**. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Incorporated, 2016.

GRÜNWARD, N. J.; GOSS, E. M. Evolution and population genetics of exotic and reemerging pathogens: traditional and novel tools and approaches. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 5.1-5.19, v. 49, p. 5.1-5.19, 2011.

HALE, M.L. et al. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS ONE* v. 7, n.9 : e45170, 2012

HANSKI, I. Metapopulation dynamics. *Nature* v. 396, p.41–49, 1998.

HIRANO, T. et al. Enigmatic incongruence between mtDNA and nDNA revealed by multi-locus phylogenomic analyses in freshwater snails. *Scientific Reports* v. 9, n.6223, 2019.

HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nature Review Genetics* v.10, n 9, p. 639–650, 2009.

IBAMA. **Rompimento da Barragem de Fundão: Documentos relacionados ao desastre da Samarco em Mariana/MG**. 2016. Disponível em: (<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/notas/2020/rompimento-da-barragem-de-fundao-documentos-relacionados-ao-desastre-da-samarco-em-mariana-mg#laudostecnicos>). Acesso em: 11 de setembro de 2022.

ICMBIO 2018. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Volume 4 – Peixes. Brasília – DF , p. 1-1232, 2018.

IGAM. Instituto Mineiro de Gestão de Águas. **Monitoramento da Qualidade das Águas Superficiais do Rio Doce no Estado de Minas Gerais**. 2021. Disponível em: (<http://www.igam.mg.gov.br/monitoramento-da-qualidade-das-aguas2/monitoramento-da-qualidade-das-aguas-superficiais-do-rio-doce-no-estado-de-minas-gerais>). Acesso em: 11 de setembro de 2022.

KITADA, S. et al. Understanding population structure in an evolutionary context: population-specific FST and pairwise FST. *G3* v. 11, p. 1-14, 2021.

JACOBINA, U. P. et al. Pleistocene Karyotypic divergence in *Hoplias malabaricus* (Teleostei: Erythrinidae) populations in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* n. 9, v. 2, p.325-333, 2011.

JOMBART, T.; BALLOUX, F.; DRAY, S. Adephylo: new tools for investigating the phylogenetic signal in biological traits. **Bioinformatics**, v. 26, n. 15, p. 1907-1909, 2010.

LITT, J.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics** v. 44, p. 397-401, 1989.

MARTA-ALMEIDA, M. et al. Fundão Dam collapse: Oceanic dispersion of River Doce after the greatest Brazilian environmental accident. **Marine pollution bulletin**, v. 112, n. 1-2, p. 359-364, 2016.

MPF - Ministério Público Federal. Procuradoria da República nos Estados De Minas Gerais e Espírito Santo. Força-Tarefa Rio Doce. **Denúncia – IPL n.º 1843/2015 SRPF/MG; Autos n.º38.65.2016.4.01.3822 (Busca e apreensão); Autos n.º3078-89.2015.4.01.3822 (Medida Cautelar); IPL Polícia Civil-MG 1271-34-2016.4.01.3822; IPL Polícia Civil-MG 1250-24.2016.4.01.3822; Procedimento Investigatório Criminal (PIC) – MPF n.º1.22.000.003490/2015-78; Procedimento Investigatório Criminal (PIC) MPF n.º 1.22.000.000003/2016-04.0.**Belo Horizonte, 2016. Disponível em: <http://www.mpf.mp.br/mg/sala-de-imprensa/docs/denuncia-samarco>. Acesso em: 11 de setembro de 2022,

NIELSEN, R. Molecular signatures of natural selection. **Annual Review of Genetics** v. 39, p. 197-218, 2005.

OVASKAINEN, O.; SAASTAMOINEN, M. Frontiers in metapopulation biology: the legacy of Ilkka Hanski. **Annual Review of Ecology and Systematics** v. 49, p. 231-252, 2018.

PIMENTEL, J. S. M. et al. High-throughput sequencing strategy for microsatellite genotyping using Neotropical fish as a model. **Frontiers in Genetics** v. 9, p.73, 2018.

PRITCHARD, J. K. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** v.155 p. 945–959, 2000.

QUEIROZ, H. M. et al. Mine tailing in a redox-active environment: iron geochemistry and potential environmental consequences. **Science of the Total Environment** v. 807, n 3, p. XXX-XXX, 2022.

QUÉROUIL, S. et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in Neotropical fish of the genus *Apistogramma* (Perciformes: Labroidei: Cichlidae). **Journal of Applied Ichthyology** v. 31, S4, p. 52-56, 2015.

RICHARD, G.F. et al. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 72 pp.686-727, 2008.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual – Anexo 7 Ictiofauna Dulcícola. RT-24, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 232 pag. 2019.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM – Sumário Executivo. RT-36A, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 16 pag. 2020.

RRDM, Rede Rio Doce Mar, Relatório Semestral de Evolução (RSE). RT-37, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 143 pag. 2021.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM – Evolução espaço-temporal do Ambiente Dulcícola. RT-39B, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. p. 613, 2022.

SANTOS, U. et al. Molecular and karyotypic phylogeography in the *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. **Journal of Fish Biology** v. 75, p.2326-2343, 2009.

SEMAD. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **Desastre Ambiental em Mariana e Recuperação do Rio Doce**. 2016. Disponível em: (<http://www.meioambiente.mg.gov.br/component/content/article/13-informativo/2879-desastre-ambiental-em-mariana-e-recuperacao-da-bacia-do-rio-doce>). Acesso em: 11 de setembro de 2022.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics** v.139, p. 457-462, 1995.

SOTA, T.; VOGLER, A.P. Incongruence of mitochondrial and nuclear gene trees in the Carabid beetles *Ohomopterus*. **Systematic Biology** v. 50, n. 1, p. 39-59, 2001.

SOUZA, F. P. et al. Novel microsatellite markers for the endangered neotropical fish *Brycon orbignyanus* and cross-amplification in related species. **Italian Journal of Animal Science** v.17, n. 4, p. 916–920, 2018.

STEIN, S. A. M. et al. Principal components analysis: a review of its application on molecular dynamics data. **Annual Reports on Computational Chemistry** v. 2, p. 233-261, 2006.

TING, N. et al. Phylogenetic incongruence between nuclear and mitochondrial markers in Asian colobines and the evolution of langurs and leaf-monkeys. **Molecular Phylogenetics and Evolution** n. 46, p.466-474, 2008.

UFV. Estudo da ictiofauna da bacia do Rio Doce após o rompimento da barragem de rejeito da Samarco. Subprojeto IV: Variações da dieta de peixes da bacia do Rio Doce. **Acordo de Cooperação Técnica UFFV- Fundação Renova**, 2022

VILLANOVA, G.V. et al. Isolation and characterization of 20 polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Leporinus obtusidens* (Characiformes: Anostomidae) using 454 shotgun pyrosequencing. **Journal of Fish Biology** v. 86, n. 3, p.1209–1217, 2015.

WAHLUND, S. Zusammensetzung von populationen und korrelationserscheinungen vom standpunkt der vererbungslehre aus betrachtet. **Hereditas** v. 11, n 1, p. 65–106, 1928.

WRIGHT, J.M. Mutations at VNTRs: Are minisatellites the evolutionary progeny of microsatellites? **Genome** v. 37, n. 2, p.345-347, 1994.

WRIGHT, S. Genetical Structure of Populations. **Nature** v.166, p. 247–249, 1950.

YAZBECK, G.M. et al. A broad genomic panel of microsatellite loci from *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Bryconidae) an endangered migratory Neotropical fish. **Scientific reports** v. 8, n.1, p. 8511, 2018.

ZAGANINI, R.L. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. **Journal of Genetics** v.91, n. 1, p.e24–e27, 2012.

ANEXO 1

Figura 10: Linhagens do Acará *Geophagus brasiliensis*, detectadas com o uso da ferramenta molecular barcode, na bacia do Rio Doce. As localidades são indicadas na Tabela 1 (a continuação).

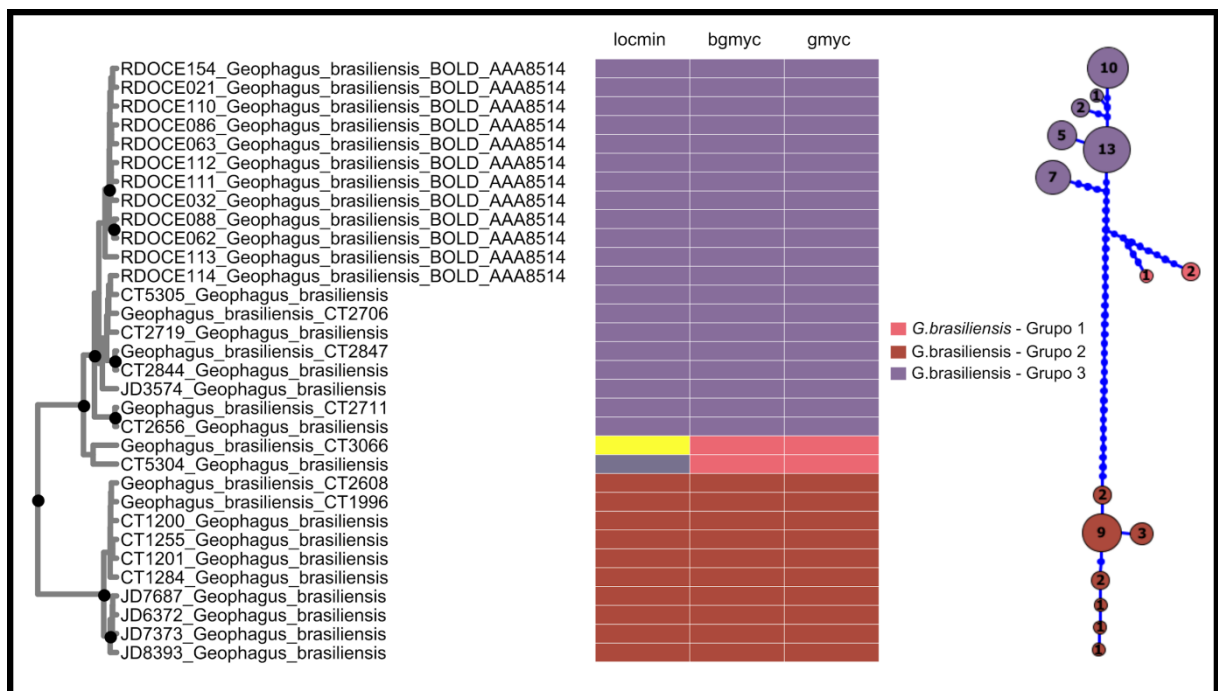


Tabela 8: Localidades selecionadas da Figura 1. O Grupo 1 é representado por espécime do alto Rio Doce e aparentado com um indivíduo do Paraíba do Sul. O Grupo 2 é formado por espécimes do Médio e Baixo Rio Doce. O Grupo 3 é formado por indivíduos do Alto e Médio Rio Doce.

Código	Localidade	Grupo
CT 5305	Rio Carmo, Barra Longa (MG)	3
CT 2706	Rio Piranga - UHE Risoleta Neces (Candongua) - Rio Doce (MG)	3
CT 2719	Rio Piranga - UHE Risoleta Neces (Candongua) - Rio Doce	3
CT 2847	Rio Santo Antônio, Ferros (MG)	3
CT 2844	Rio Santo Antônio, Ferros (MG)	3
JD 3574	Rio Casca, Alto Rio Doce	3
CT 2711	Córrego do Latão - Clube do Sossego, Coimbra (MG)	3
CT 2656	Córrego do Latão - Clube do Sossego, Coimbra (MG)	3
CT3066	Ribeirão Espírito Santo, bacia R. Paraíba do Sul	1
CT5304	Rio Carmo, Barra Longa (MG)	1
CT5305	Rio Carmo, Barra Longa (MG)	2
CT2706	Rio Piranga - UHE Risoleta Neves (Candongua)	2
CT2719	Rio Piranga - UHE Risoleta Neves (Candongua)	2
CT2847	Rio Santo Antônio, Ferros (MG)	2
CT2844	Rio Santo Antônio, Ferros (MG)	2
CT3574		2
CT2711	Córrego do Latão - Rio Piranga	2
CT2656	Córrego do Latão - Rio Piranga	2