

**Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular**

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA POPULACIONAL DE *Salminus hilarii*
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE) NA BACIA DO ALTO PARANÁ**

ALINE GALINDO NUNES

São Carlos - SP
2015

**Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular**

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA POPULACIONAL DE *Salminus hilarii*
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE) NA BACIA DO ALTO PARANÁ**

ALINE GALINDO NUNES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências área de concentração: Genética e Evolução.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Patrícia Domingues de Freitas

São Carlos – SP
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N972eg Nunes, Aline Galindo
Estruturação genética populacional de *Salminus hilarii* (Characiformes : Characidae) na Bacia do Alto Paraná / Aline Galindo Nunes. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
101 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Genética de populações. 2. Tabarana. 3. Bacia do alto Paraná. 4. Microsatélites. 5. D-loop. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Aline Galindo Nunes, realizada em 13/08/2015:

Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas
UFSCar

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
UFSCar

Prof. Dr. Alberto Luciano Carmassi
UFSCar

Prof. Dr. Fábio Porto Foresti
UNESP

Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres
UFPE

Meus queridos pais, Vamberto e Márcia, e minhas irmãs, pelo carinho e compreensão. Meus amigos que me incentivaram quando tudo parecia impossível e inatingível. Com muito amor e carinho, dedico esta vitória a vocês!

AGRADECIMENTOS

Quero expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. A todas essas pessoas fica a minha eterna gratidão, em especial:

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Patrícia Domingues de Freitas, pela oportunidade, confiança, apoio e paciência. Aos professores Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior e Prof. Dr. Orlando Moreira Filho pelos ensinamentos durante toda minha pós-graduação.

A todas as pessoas que tive o prazer de conviver no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação, pela amizade, conselhos, discussões e paciência. Todo esse convívio me ensinou que a felicidade está em pequenas coisas ou atitudes.

Aos pescadores que me ajudaram nas coletas, Máximo, Lucas, Esteban, Alline, Raphael, Conrado, Gallo, Rosane, Ueslei, Prof. Alberto e ao meu pai. À Polícia Ambiental do estado de São Paulo, pelo apoio. Se não fosse por vocês a realização desse trabalho não seria possível.

Aos meus pais Vamberto e Márcia pelos sacrifícios e pela sabedoria com que me orientaram para a vida. Minhas irmãs, Láira e Tháís, meus sobrinhos Gustavinho e Laís, pela fonte inesgotável de alegria. A toda minha família que sempre me deu apoio em todos os momentos da minha vida. Amo todos vocês!

Ao meu grande amigo e namorado Flávio, por todos esses anos de muito carinho, amizade, companheirismo e felicidade. Por me dar forças nos momentos mais delicados e por me fazer acreditar sempre.

A todos os amigos que estiveram comigo nessa batalha. Por toda amizade nas horas alegres e tristes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela bolsa concedida durante o doutorado.

Meu obrigado e meu carinho a todos.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente. Quem sobrevive é o mais disposto à mudança.”

Charles Darwin

RESUMO

NUNES, A. G. **Estruturação genética populacional de *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) na bacia do alto Paraná.** 2015. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

O gênero *Salminus* é caracterizado por peixes predadores de médio à grande porte, migradores e ictiófagos, muito apreciados na pesca e na gastronomia. Dentre esses, destaca-se a espécie *Salminus hilarii*, conhecida popularmente como tabarana e considerada topo de cadeia alimentar, devido ao seu alto grau de seletividade por ambientes com águas ricas em oxigênio o que torna a espécie uma bom indicador ambiental. Essa espécie ocorre nas bacias do São Francisco, alto rio Paraná e do rio Jaguaribe e depende de condições hidrológicas específicas para realizar sua reprodução. Dentro desse contexto e devido à intensa interferência antrópica que tais sistemas hidrográficos vêm sofrendo, estudar populações de tabaranas na bacia do alto Paraná pode contribuir efetivamente para o melhor entendimento de aspectos relacionados à sua estrutura populacional e conservação da espécie. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a estrutura genética de populações de *S. hilarii* em diferentes períodos em rios da bacia do alto Paraná, com o intuito de compreender melhor a dinâmica populacional desse peixe e contribuir efetivamente para sua conservação. Para as análises moleculares utilizou-se 15 locos polimórficos de microssatélites e o mtDNA (D-loop). Os resultados obtidos revelaram a existência de diferenciação populacional entre os rios amostrados. Apesar disso, os indivíduos amostrados no rio Jacaré-pepira e ribeirão do Cubatão não apresentaram diferença genética entre eles, indicando a ocorrência de fluxo gênico entre as populações suficiente para manter a homogeneidade genética. Além disso, foi possível identificar a estruturação temporal dentro do rio Turvo e do rio Jacaré-pepira. Uma alta diversidade genética foi encontrada nas populações dos rios amostrados da bacia do alto Paraná. As análises do D-loop não evidenciaram estruturação populacional entre as amostragens, mas indicou a ocorrência de uma alta diversidade. A contradição dos resultados deve-se as taxas mutacionais dos marcadores utilizados, uma vez que os microssatélites possuem taxas mutacionais elevadas. Esses resultados são importantes para o entendimento do comportamento e biologia desses peixes e, ainda, para estabelecer programas de manejo de pesca e conservação de *S. hilarii* na bacia do alto Paraná.

Palavras-chave: Tabarana; Bacia do alto Paraná; Microssatélites; D-loop; Estruturação genética

ABSTRACT

NUNES, A. G. **Population genetic structure of *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) in the Upper Paraná basin.** 2015. PhD Thesis – Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

The *Salminus* genus is characterized by predatory fish medium to large, migratory and ichthyophagi, very appreciated in fisheries and gastronomy. Among these stands out the *Salminus hilarii* species, popularly known as tabarana and considered top of the food chain, due to its high degree of selectivity for environments with rich water oxygen which constitutes a good environmental indicator. This species occurs in the São Francisco basins, Paraná basins and Jaguaribe river, and depends on specific hydrological conditions to carry out their reproduction. In this context and because of intense anthropogenic interference that such river systems have suffered, population's study of tabaranas in the upper Paraná basin can contribute to a better understanding of aspects related to its population structure and conservation of their populations. Thus, the aim of this study was to characterize the population genetic structure of *S. hilarii* at different periods in rivers of the Upper Paraná basin, in order to better understand the population dynamics of fish and effectively contribute to their conservation. It was used for molecular analysis 15 polymorphic microsatellite loci and mtDNA (D-loop). The results revealed the existence of population differentiation among the rivers sampled. Nevertheless, individuals sampled in the Jacaré-pepira river and Cubatão showed no genetic difference, indicating the occurrence of gene flow between populations sufficient to maintain the genetic homogeneity. Moreover, it was possible to identify the temporal structure into the Turvo and Jacaré-pepira river. A high genetic diversity was found in populations of Upper Paraná basin sampled rivers. The D-loop analysis showed no population structure between samples, but indicated the occurrence of a high diversity. The contradictory results may be due to mutational rates of the markers used, since microsatellites have high mutational rate. These results are important for understanding the behavior and biology of these fish, and also to establish fisheries management programs and conservation *S. hilarii* in the upper Paraná basin.

Keywords: Tabarana; Upper Paraná basin; Microsatellites; D-loop; Genetic structure

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Mapa da localização geográfica da Bacia hidrográfica do alto Paraná.	18
FIGURA 2 – Mapa da América do Sul, mostrando a distribuição do gênero <i>Salminus</i>	23
FIGURA 3 – Aspecto morfológico de um indivíduo da espécie <i>S. hilarii</i>	24
FIGURA 4 – Mapa do leste da América do Sul, mostrando a distribuição de <i>Salminus hilarii</i>	25
FIGURA 5. Rios amostrados na bacia do alto Paraná, localizados no estado de São Paulo.	31
FIGURA 6 – Esquema de reação de amplificação com o uso da cauda universal M13. A. <i>Primer forward</i> acrescido da cauda M13. B. <i>Primer reverse</i> . C. Cauda M13 marcada com fluoróforo. D. Anelamento dos <i>primers</i> específicos às regiões flangeadoras do microssatélite, com posterior amplificação. E. Anelamento da cauda M13 na sequência complementar. F. DNA microssatélite amplificado adicionado da cauda M13 marcada com fluoróforo.	36
FIGURA 7 - Estimativa do número real de populações de <i>S. hilarii</i> de acordo com o método de Pritchard (2000) evidenciando $k=1$	42
FIGURA 8 - Gráfico da atribuição dos indivíduos de <i>S. hilarii</i> obtido pelo Structure com $k = 2$, sem informação <i>a priori</i> , representando a não diferenciação das populações no rio do Carmo. Os números laterais indicam a probabilidade de o indivíduo pertencer à determinada população. 1: Dezembro/2011, 2: Outubro/2013.....	42
FIGURA 9 - Representação gráfica da análise fatorial de correspondência considerando duas populações prévias de <i>S. hilarii</i>	43
FIGURA 10 - Rede haplotípica de <i>S. hilarii</i> a partir de sequências de D-loop.....	47
FIGURA 11 - Árvore de distância de <i>S. hilarii</i> construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Neighbor-Joining.	47
FIGURA 12 - Árvore filogenética de <i>S. hilarii</i> construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Máxima Verossimilhança.	47
FIGURA 13 - Estimativa do número de populações de acordo com o método de Pritchard (2000) evidenciando $k=1$	49
FIGURA 14 - Gráfico da atribuição dos indivíduos de <i>S. hilarii</i> obtido pelo Structure com $k = 2$, sem informação <i>a priori</i> , representando uma população não diferenciada no ribeirão Cubatão. Os números laterais indicam a probabilidade de o indivíduo pertencer à determinada população.	50
FIGURA 15 - Representação gráfica da análise fatorial de correspondência considerando duas populações prévias de <i>S. hilarii</i>	50
FIGURA 16 - Rede haplotípica de <i>S. hilarii</i> a partir de sequências de D-loop.....	55
FIGURA 17 - Árvore de distância de <i>S. hilarii</i> construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Neighbor-Joining.	55

FIGURA 18 - Árvore filogenética de <i>S. hilarii</i> construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Máxima Verossimilhança.	56
FIGURA 19 - Estimativa do número real de populações de acordo com o método Evanno et al (2005), evidenciando $k = 4$ (à esquerda) e de Pritchard (2000) evidenciando $k = 1$ (à direita).	58
FIGURA 20 - Gráfico da atribuição dos indivíduos de <i>S. hilarii</i> obtido pelo Structure com $k = 4$, sem informação <i>a priori</i> , no rio Jacaré-pepira. Os números laterais indicam a probabilidade de o indivíduo pertencer à determinada população... 58	58
FIGURA 21 - Representação gráfica da análise fatorial de correspondência considerando duas populações prévias de <i>S. hilarii</i>	59
FIGURA 22 - Rede haplotípica de <i>S. hilarii</i> a partir de sequencias de D-loop.....	65
FIGURA 23 - Árvore de distância de <i>S. hilarii</i> construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Neighbor-Joining.	66
FIGURA 24 - Árvore filogenética de <i>S. hilarii</i> construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Máxima Verossimilhança.	67
FIGURA 25 - Estimativa do número real de populações de acordo com o método Evanno et al (2005), evidenciando $k = 3$ (à esquerda) e de Pritchard (2000) evidenciando $k = 3$ (à direita).	69
FIGURA 26 - Gráfico da atribuição dos indivíduos de <i>S. hilarii</i> obtido pelo Structure com $k = 3$, sem informação <i>a priori</i> , representando uma população estruturada no rio Turvo. Cada linha na vertical representa um indivíduo, que possui probabilidades diferentes de ser atribuído a cada um dos <i>clusters</i> , indicados pelas distintas cores.	70
FIGURA 27 - Representação gráfica da análise fatorial de correspondência de <i>S. hilarii</i> . 70	70
FIGURA 28 - Rede haplotípica de <i>S. hilarii</i> a partir de sequencias de D-loop.....	76
FIGURA 29 - Árvore de distância de <i>S. hilarii</i> construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Neighbor-Joining.	77
FIGURA 30 - Árvore filogenética de <i>S. hilarii</i> construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Máxima Verossimilhança.	78
FIGURA 31 - Estimativa do número de populações de acordo com o método Evanno et al (2005), evidenciando $k = 3$ (à esquerda) e de Pritchard (2000) evidenciando $k = 5$ (à direita).	81
FIGURA 32 - Gráfico de barras obtido pelo STRUCTURE sem informação <i>a priori</i> , representando uma população não estruturada de <i>S. hilarii</i> no rio Jacaré-pepira. População: 1. rio do Carmo, 2. rib. do Cubatão, 3. rio Jacaré-pepira, 4. rio Turvo.	81
FIGURA 33 - Representação gráfica da análise de fatorial de correspondência.	82
FIGURA 34 - Rede haplotípica de <i>S. hilarii</i> a partir de sequencias de D-loop.....	88

FIGURA 35 - Árvore de distância de *S. hilarii* construída a partir de sequências de D-loop com valores de *bootstrap* correspondentes ao método de distância Neighbor-Joining. Rio do Carmo (rosa), rib. do Cubatão (verde), rio Jacaré-pepira (amarelo), rio Turvo (azul), Grupo externo *Salminus franciscanus* (preto). 89

FIGURA 36 - Árvore filogenética de *S. hilarii* construída a partir de sequências de D-loop com valores de *bootstrap* correspondente ao método de Máxima Verossimilhança. Rio do Carmo (rosa), rio do Cubatão (verde), rio Jacaré-pepira (amarelo), rio Turvo (azul), Grupo externo *Salminus franciscanus* (preto). 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de indivíduos de <i>Salminus hilarii</i> amostrados no rio do Carmo, Ituverava – SP.....	32
Tabela 2. Número de indivíduos de <i>Salminus hilarii</i> amostrados no ribeirão do Cubatão, Potirendaba – SP.....	32
Tabela 3. Número de indivíduos de <i>Salminus hilarii</i> amostrados no rio Jacaré-pepira, Brotas – SP.	33
Tabela 4 - Número de indivíduos de <i>S. hilarii</i> amostrados no rio Turvo.	34
Tabela 5. Características dos nove locos heterólogos (ROSSINI et al., 2011).	36
Tabela 6. Características dos seis locos espécie-específicos (SILVA; HILSDORF, 2011).	37
Tabela 7 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de F_{ST} , R_{ST} e de D_{est}	41
Tabela 8 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.	41
Tabela 9 - Dados de diversidade genética de <i>S. hilarii</i> amostrados no rio do Carmo.	44
Tabela 10 - Valores de P para o teste de excesso de heterozigotos de <i>Salminus hilarii</i> no rio do Carmo, dados obtidos pelo programa Bottleneck.....	45
Tabela 11 - Número de indivíduos de <i>S. hilarii</i> utilizados nas análises da Região Controle (D-loop).	45
Tabela 12 - Estimativas F_{ST} par-a-par e valores de P de F_{ST}	45
Tabela 13 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.....	46
Tabela 14 - Diversidade haplotípica e Teste de Neutralidade de <i>S.hilarii</i>	46
Tabela 15 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de F_{ST} , R_{ST} e de D_{est}	48
Tabela 16 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.....	49
Tabela 17 - Dados de diversidade genética por loco de <i>S. hilarii</i> amostrados no ribeirão do Cubatão.	51
Tabela 18 - Valores de P para o teste de excesso de heterozigotos de <i>S. hilarii</i> no ribeirão do Cubatão, dados obtidos pelo teste de Wilcoxon no programa Bottleneck. .	53
Tabela 19 - Número de indivíduos de <i>Salminus hilarii</i> utilizados nas análises da Região Controle (D-loop).	53
Tabela 20 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de F_{ST} de P de F_{ST}	53
Tabela 21 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.....	54
Tabela 22 - Diversidade haplotípica e Teste de Neutralidade de <i>S.hilarii</i>	54
Tabela 23 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de R_{ST} abaixo da diagonal e de F_{ST} acima.....	56

Tabela 24 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de D_{est} abaixo da diagonal.	57
Tabela 25 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.	57
Tabela 26 - Dados de diversidade genética por loco de <i>S. hilarii</i> amostrados no rio Jacaré-pepira, amostragem Abril de 2012.	61
Tabela 27 - Dados de diversidade genética por loco de <i>S. hilarii</i> amostrados no rio Jacaré-pepira, amostragem Novembro de 2012/Janeiro de 2013.	61
Tabela 28 - Dados de diversidade genética por loco de <i>S. hilarii</i> amostrados no rio Jacaré-pepira, amostragem Outubro de 2013.	62
Tabela 29 - Dados de diversidade genética por loco de <i>S. hilarii</i> amostrados no rio Jacaré-pepira, amostragem Outubro de 2014.	62
Tabela 30 - Valores de P para o teste de excesso de heterozigotos de <i>Salminus hilarii</i> no rio do Cubatão, dados obtidos pelo teste de Wilcoxon no programa Bottleneck.	63
Tabela 31 - Número de indivíduos de <i>S. hilarii</i> utilizados nas análises da Região Controle (D-loop).	64
Tabela 32 - Estimativas F_{ST} par-a-par (diagonal abaixo) e valores de P de F_{ST} (diagonal acima)	64
Tabela 33 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.	64
Tabela 34 - Diversidade haplotípica e Teste de Neutralidade de <i>S. hilarii</i> referente à análise da Região Controle (D-loop).	65
Tabela 35 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de R_{ST} abaixo da diagonal e de F_{ST} acima.	68
Tabela 36 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de D_{est} abaixo da diagonal.	68
Tabela 37 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.	69
Tabela 38 - Dados de microssatélites de <i>S. hilarii</i> da amostragem 2011/2013.	72
Tabela 39 - Dados de microssatélites de <i>S. hilarii</i> da amostragem Novembro de 2014.	73
Tabela 40 - Dados de microssatélites de <i>S. hilarii</i> da amostragem Fevereiro de 2015.	73
Tabela 41 - Valores de P para o teste de excesso de heterozigotos de <i>Salminus hilarii</i> nos rios da bacia do alto Paraná, dados obtidos pelo teste de Wilcoxon no programa Bottleneck.	74
Tabela 42 - Número de indivíduos de <i>S. hilarii</i> utilizados nas análises da Região Controle (D-loop).	74
Tabela 43 - Estimativas F_{ST} par-a-par (diagonal abaixo) e valores de P de F_{ST} (diagonal acima).	75
Tabela 44 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.	75

Tabela 45 - Diversidade haplotípica e Teste de Neutralidade de <i>S.hilarii</i> referente à análise da Região Controle (D-loop).	75
Tabela 46 - Número de indivíduos de <i>Salminus hilarii</i> utilizados nas análises de microssatélites.	79
Tabela 47 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de R_{ST} abaixo da diagonal e de F_{ST} acima.....	79
Tabela 48 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de D_{est} abaixo da diagonal.	79
Tabela 49 - Resultados da AMOVA e F_{ST} -global	80
Tabela 50 - Dados de microssatélites de <i>S. hilarii</i> da amostragem Cubatão-Jacaré.	84
Tabela 51 - Dados de microssatélites de <i>S. hilarii</i> da amostragem do rio Turvo.....	84
Tabela 52 - Valores de P para o teste de excesso de heterozigotos de <i>Salminus hilarii</i> nos rios da bacia do alto Paraná, dados obtidos pelo teste de Wilcoxon no programa Bottleneck.....	85
Tabela 53 - Número de indivíduos de <i>Salminus hilarii</i> utilizados nas análises da Região Controle (D-loop).	86
Tabela 54 - Estimativas F_{ST} par-a-par (diagonal abaixo) e valores de P de F_{ST} (diagonal acima)	86
Tabela 55 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.....	86
Tabela 56 - Diversidade haplotípica e Teste de Neutralidade de <i>S.hilarii</i>	87

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.1 Bacia do alto do Paraná.....	18
1.2 Peixes Neotropicais.....	20
1.3 Espécie de Estudo	21
1.3.1 <i>Considerações gerais do gênero <i>Salminus</i></i>	<i>21</i>
1.3.2 <i><i>Salminus hilarii</i> Valenciennes, 1849.</i>	<i>23</i>
1.4 Aplicação de marcadores moleculares na genética da conservação de peixes neotropicais.....	26
2 HIPÓTESES.....	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Área de estudo e amostragem	31
4.1.1 <i>Rio do Carmo</i>	<i>32</i>
4.1.2 <i>Ribeirão do Cubatão ou Barra Mansa</i>	<i>32</i>
4.1.3 <i>Rio Jacaré-pepira.....</i>	<i>33</i>
4.1.4 <i>Rio Turvo</i>	<i>33</i>
4.2 Extração e quantificação de DNA.....	34
4.3 Amplificação dos locos de microssatélites e genotipagem	35
4.4 Amplificação do D-loop, purificação e sequenciamento	37
4.5 Análise estatística dos dados	37
4.5.1 <i>Microssatélites</i>	<i>37</i>
4.5.2 <i>D-loop</i>	<i>39</i>
5 RESULTADOS	41
5.1 Rio do Carmo.....	41
5.2 Ribeirão do Cubatão ou Barra Mansa.....	48
5.3 Rio Jacaré-pepira.....	56
5.4 Rio Turvo.....	68
5.5 Alto Paraná	79
6 CONCLUSÃO.....	91

REFERÊNCIAS BIBOGRÁFICAS	92
--------------------------------	----

INTRODUÇÃO

De acordo com Frankham; Ballou; Briscoe (2008)

A diversidade biológica do planeta está sendo rapidamente esgotada devido às consequências diretas e indiretas das atividades humanas (destruição do habitat e fragmentação, sobre-exploração, poluição e movimentação de espécies para novas localidades). Essas reduzem os tamanhos das populações para níveis onde eventos estocásticos adicionais (demográficos, ambientais, genéticos e catastróficos) levam-na em direção à extinção.

Diante destas palavras, temos uma breve visão do quão importante são estudos de genética da conservação que visam ajudar na conservação das populações ou espécies por meio do uso da teoria e de técnicas da genética. Esses estudos têm sido destaques não somente em espécies *in situ* como também *ex situ* nos últimos anos.

Análises da variabilidade genética de peixes utilizando metodologias moleculares têm auxiliado questões relativas à identificação de espécies (PARSON et al., 2000) e diferenciação entre populações em diferentes sistemas hidrográficos (WASKO; GALETTI JR, 2002; HATANAKA et al., 2006; ARARIPE et al., 2013; RIBOLLI, 2014; FERREIRA et al., 2015, SILVA, 2015). Essas análises têm possibilitado o estudo genético de espécies ameaçadas de extinção, contribuindo com o levantamento de informações sobre a biologia desses animais e com dados para estabelecimento de medidas de conservação (SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTÍ, 2001; MOYSÉS; ALMEIDA-TOLEDO, 2002; PRIOLI et al., 2002; MATSUMOTO; HILSDORF, 2009).

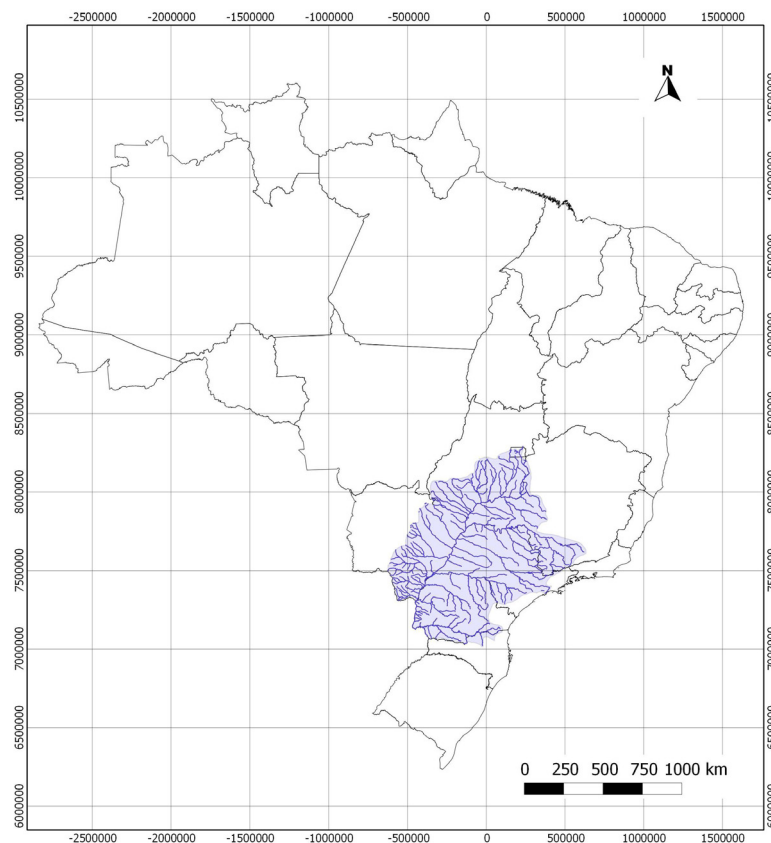
Nesse trabalho, a espécie alvo é *Salminus hilarii*, um peixe da família *Characidae* que é considerado uma das espécies migradoras mais importantes na região do alto Paraná (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2004). Frente à intensa atividade antrópica e à importância que esse sistema hidrográfico representa para as populações de *S. hilarii*, estudar populações dessa espécie nessa região pode contribuir, efetivamente, para o melhor entendimento de aspectos relacionados à sua biologia e conservação. Frente a esse contexto, o objetivo principal desse trabalho é caracterizar a estrutura genética de diferentes populações da espécie em questão em rios da bacia do alto Paraná. Além de avaliar a diversidade genética, considerada componente essencial para manutenção de uma espécie. O conhecimento sobre a estrutura genética das populações se faz necessário para uma estratégia efetiva de conservação e manejo da espécie.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Bacia do alto do Paraná

A bacia do Paraná (FIGURA 1) é uma ampla bacia sedimentar situada na porção centro-leste da América do Sul e possui uma área de cerca de 1,5 milhões de km². Essa bacia se distribui no centro-sul do Brasil, no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai e no norte do Uruguai. Aproximadamente 75 % de sua área distribui-se no Brasil abrangendo os estados de São Paulo (25 % da região), Paraná (21 %), Mato Grosso do Sul (20 %), Minas Gerais (18 %), Goiás (14 %), Santa Catarina (1,5 %) e o Distrito Federal (0,5 %) (AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS, 2015). A bacia hidrográfica do Alto Paraná inclui toda a drenagem do rio Paraná à montante do antigo Salto de Sete Quedas, com uma vasta área de aproximadamente 900 mil km² (BONETTO, 1986; BRITSKI; LANGEANI, 1988; LANGEANI et al., 2007).

FIGURA 1 – Mapa da localização geográfica da Bacia hidrográfica do alto Paraná.



Fonte: Elaborado no programa QUANTUMGIS.

A ictiofauna da bacia do rio Paraná é estimada em 600 espécies, sendo que apenas o Pantanal possui cerca de 400 espécies (FERRAZ DE LIMA, 1981; BONETTO, 1986; AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007). Agostinho e Júlio Jr. (1999) estimam que há pelo menos 250 espécies de peixes na bacia do alto Paraná. De acordo com Castro e Menezes (1998), o sistema do alto Paraná inclui os maiores rios do estado de São Paulo e contém 22 famílias e aproximadamente 170 espécies de peixes descritas, sendo que cerca de 80 % das espécies registradas pertencem às ordens Siluriformes e Characiformes (LANGEANI et al., 2007). O alto rio Paraná, e os rios e riachos que formam essa bacia, altamente modificados nos últimos 50 anos, são extremamente importantes para a manutenção das comunidades aquáticas. Essa diversidade pode ser diretamente correlacionada à heterogeneidade estrutural, bem como à história geológica dessa região (NAKATANI et al., 2001).

No estado de São Paulo, a porção alta da bacia do Paraná ocupa a maior parte do estado e possui numerosos cursos d'água. A maioria desses rios têm sofrido intensas alterações ambientais e biológicas em consequência da exploração agropecuária, construção de barragens, desmatamento das matas ciliares, despejo de esgoto doméstico e industrial e introdução de espécies alóctones e exóticas de peixes (GARUTTI, 1988; CETESB, 2008). Nessa bacia, os principais rios, como o Paranaíba, Grande, Tietê, Paranapanema e Iguazu, tiveram seus cursos transformados em cascata de reservatórios, reduzindo drasticamente os trechos lóticos. A construção de barragens provoca profundas alterações no ambiente, com implicações decisivas sobre a fauna e flora, e em especial, sobre as comunidades de peixes. Mudança de caráter lótico para semi-lêntico ou lêntico favorece espécies lacustres em detrimento das reofílicas (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007). Além das grandes barragens das usinas hidrelétricas, essa região também sofre impacto das Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs). Apesar da Agência Nacional de Energia Elétrica – ANEEL considerar que essas instalações causam menores impactos ambientais, ainda assim é capaz de fragmentar o corpo d'água o qual está instalado.

A sucessão de barramentos em cascata exerce forte pressão negativa sobre as populações de peixes migradores. Essa pressão causa, além da interrupção das rotas migratórias, a fragmentação efetiva de ambientes e ausência de trechos lóticos entre barragens. (FERNANDO; HOLCIK, 1991; WOYNAROVICH, 1991; CARVALHO et al., 1998; AGOSTINHO et al., 2002)

Para algumas espécies de peixes neotropicais a migração exerce papel fundamental para seu processo reprodutivo, por permitir a busca por ambientes adequados para fertilização dos ovos, desenvolvimento inicial e condições de baixas taxas de predação. Ainda, a migração se faz necessária para a maturação das gônadas nesses peixes. As barragens de usinas hidrelétricas, dependendo de sua posição em relação à área vital dessas espécies, podem interromper seus acessos às áreas de desova (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007).

1.2 Peixes Neotropicais

A cada dia centenas de novas espécies de animais e plantas são descritas. De acordo com Froese e Pauly (2009), das 31.200 espécies de peixes descritas, aproximadamente 13.000 são exclusivas de ambientes de água doce, sendo a maior parte dessa riqueza e diversidade encontrada em águas tropicais (LOWE-MCCONNELL, 1999). Dentre os peixes de água doce, ou continentais, as espécies neotropicais somam, somente na América Latina, aproximadamente 46 % da ictiofauna continental mundial. São cinco os grupos principais de peixes neotropicais: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Perciformes e Atherinomorpha. Dentre esses, os Characiformes formam o grupo mais diversificado (MALABARBA et al., 1998). As espécies de Characiformes e Siluriformes são predominantes em todas as bacias sul-americanas e a composição específica, bem como o número de espécies entre bacias, varia consideravelmente (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007). Langeani et al. (2007) destacam que a maior diversidade de espécies se concentra na bacia Amazônica e na bacia do rio Paraná.

A grande diversidade de espécies está relacionada a uma enorme variedade de formas e padrões comportamentais, como forma de alimentação, manutenção e reprodução, que definem a estratégia de vida das espécies (WOOTON, 1990; AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007). Os peixes neotropicais caracterizam-se por apresentarem a maior variedade de tipos de estratégias de vida entre os vertebrados, em resposta a estímulos ambientais (WOOTON, 1990). Os atributos da história de vida, tais como alimentação e reprodução, são as bases onde atua a seleção natural, além de serem responsáveis pelos padrões ecológicos existentes na distribuição e abundância das espécies (HARRIS, 1999; AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007).

É possível classificar os peixes neotropicais como espécies sedentárias ou grandes migradoras em relação ao uso do espaço vital requerido durante seu ciclo de vida. Entretanto, há um grande número de espécies que se posicionam ao longo de um gradiente contínuo entre essas duas categorias (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007). Espécies com hábitos migradores ou sedentários e cuja atividade reprodutiva está relacionada à sazonalidade hidrológica estão distribuídas em todas as bacias hidrográficas sulamericanas (AGOSTINHO et al., 2007).

Em geral, as espécies sedentárias são aquelas que desenvolvem todas suas atividades vitais, como alimentação, reprodução e crescimento numa área restrita da bacia. Os deslocamentos, quando ocorrem, são de curta extensão. Esses peixes são frequentes em riachos e ribeirões, mas também se adaptam às condições represadas, como ocorre com algumas espécies que, porém, dependem de outros ambientes para completar etapas de seu ciclo de vida, principalmente relacionadas à reprodução (AGOSTINHO, VAZZOLER, THOMAZ, 1995).

Já as espécies de grandes migradores, também conhecidas como potádromas, necessitam de amplos trechos livre da bacia para se deslocar por grandes distâncias. Essas espécies requerem ambientes específicos durante as diferentes etapas do processo reprodutivo, sendo a migração apenas uma parte de suas estratégias reprodutivas. Além da migração reprodutiva, esses peixes também realizam migrações de caráter térmico ou sazonal, trófico ou nutricional e de crescimento, quase todas associadas ao regime hidrológico (BONETTO; CASTELLO, 1985; GOULDING; SMITH; MAHAR, 1996; AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007). Segundo VAZZOLER (1996), a maioria das espécies de peixes inicia seu desenvolvimento gonadal em uma época anterior àquela de reprodução, completando sua maturação no momento em que as condições ambientais forem adequadas à fecundação e ao desenvolvimento da prole.

1.3 Espécie de Estudo

*1.3.1 Considerações gerais do gênero *Salminus**

O gênero *Salminus* é um grupo de peixes bastante popular e muito apreciado na pesca e gastronomia. Ele é caracterizado por englobar peixes predadores de médio à grande

porte, ictiófagos, encontrados principalmente nos grandes rios (GODOY, 1975; BRITISKI, 1988). Os representantes desse gênero habitam águas movimentadas e são comumente encontrados na boca de cachoeiras, choros d'água e corredeiras (SANTOS, 1987). Realizam migrações periódicas para alimentação, nos lares de alimentação, ou para reprodução, em busca dos chamados lares de reprodução (GODOY, 1975). Procriam no leito dos rios em estações chuvosas, apresentando período reprodutivo altamente sazonal, alta fecundidade, ovos livres e ausência de cuidado parental. (AGOSTINHO; JÚLIO JR, 1999).

Os peixes desse grupo pertencem à ordem Characiformes e estão incluídos na família Characidae *Incertae sedis* (sensu LIMA et al., 2003). Segundo Lima (2006), existem atualmente cinco espécies definidas por meio de caracteres morfológicos: *Salminus brasiliensis*, *Salminus franciscanus*, *Salminus affinis*, *Salminus iquitensis* e *Salminus hilarii*. Porém, estudos moleculares recentes apontam que dentro desse gênero possam existir mais espécies (SILVA et al., 2013). Embora muitos grupos dentro dessa ordem tenham sido objeto de vários estudos de taxonomia e sistemática (ORTÍ; MEYER, 1997; CALCAGNOTTO; SCHAEFER; DESALLE, 2005; ABE et al., 2013; ABE et al., 2014; MELO et al., 2014), o conhecimento das relações filogenéticas da maioria de seus táxons é muito restrito. Ainda que a maior parte das famílias que compõem a ordem já possa ser identificada por caracteres sinapomórficos (REIS et al., 2003), Characidae é, atualmente, reconhecida como uma família não monofilética (ABE et al., 2014).

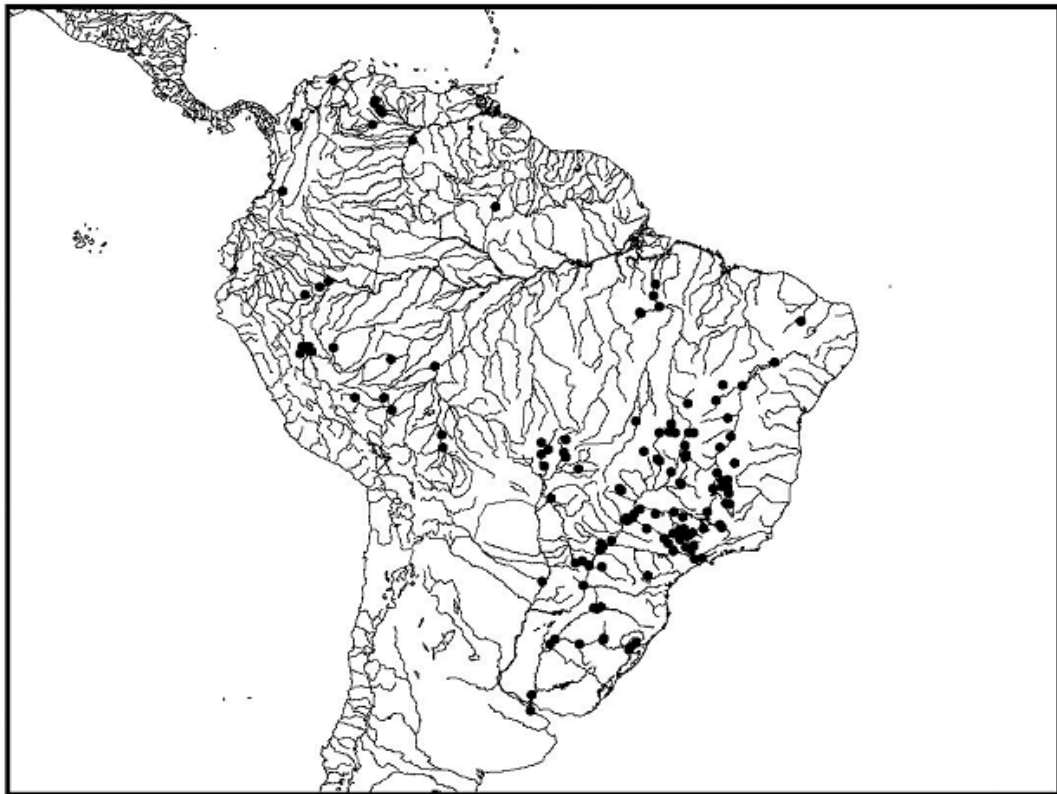
Segundo Godoy (1975), as espécies de *Salminus* são muito similares, tanto em cor, como em forma e tamanho. Entretanto, *S. affinis* é mais parecida com a espécie *S. iquitensis*, que também é a espécie mais próxima filogeneticamente, tendo um colorido claro com brilho prateado; nadadeira caudal vermelha; nadadeiras dorsal, anal, adiposa, peitorais e pélvicas alaranjadas. *S. brasiliensis* e *S. franciscanus* são os únicos legítimos dourados, sendo que as demais espécies de *Salminus* apresentam coloração prateadas em vida. Essas duas espécies se diferenciam entre si principalmente pela contagem de escamas que é ligeiramente maior em *S. brasiliensis* (LIMA, 2006).

Durante o período reprodutivo, esses peixes apresentam ganchos nas nadadeiras pélvicas e anal. Essa é uma característica presente nos machos da maioria dos *Characidae* (MALABARBA; WEITZMAN, 2003), sendo documentado por Moraes Filho e Schubart (1955) na espécie *S. brasiliensis*. Godoy (1975), baseado em observações sobre a espécie na bacia do Rio Mogi-Guaçu, relata que a presença de ganchos, ou espículos, na

nadadeira anal é uma característica exclusiva dos machos, e desaparece ao fim do período reprodutivo.

As espécies desse gênero possuem ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas bacias da Amazônia, Orinoco, La Plata e do rio São Francisco, na América do Sul cisandina, no rio Magdalena e em algumas outras drenagens em porções transandinas do continente (LIMA; BRITISKI, 2007) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – Mapa da América do Sul, mostrando a distribuição do gênero *Salminus*.



Fonte: LIMA; BRITISKI, 2007.

1.3.2 *Salminus hilarii* Valenciennes, 1849.

Salminus hilarii (FIGURA 3), popularmente conhecida como dourado branco, tubarana ou tabarana, é uma das espécies migradoras mais importantes na região do alto Paraná, considerada como peixe reofilico ou de piracema (AGOSTINHO et al., 2004b). Esses peixes são planctófagos nas primeiras fases da vida larval, na fase de alevino, passam a ser insetívoros e, posteriormente, nas fases de jovem e adulto, tornam-se ictiófagos (GODOY, 1975). Várias espécies são presas típicas da tabarana na bacia do rio Sorocaba (estado de São

Paulo) sendo *Astyanax fasciatus*, *A. altiparanae* e *Pimelodella sp* as mais abundantes (VILLARES JR; GOMIERO; GOITEIN, 2007). Paiva (1959) examinou o conteúdo estomacal de 58 *Salminus hilarii* do rio Salgado (bacia do rio Jaguaribe, estado do Ceará) e encontrou predominantemente invertebrados (insetos e camarões), menor quantidade de peixes, como pequenos caracídeos, *Triportheus signatus*, *Pimelodella sp.*, *Loricariidae*, e até mesmo outro *S. hilarii*, notando que a frequência de peixes na dieta aumentou com o tamanho dos indivíduos (LIMA, 2006).

FIGURA 3 – Aspecto morfológico de um indivíduo da espécie *S. hilarii*.



Fonte: Foto tirada pela autora

A tabarana difere das outras espécies de *Salminus* por possuir um colorido em geral cinza, mais claro ventralmente, com brilho prateado; nadadeira caudal vermelha; nadadeiras peitorais, pélvicas, dorsal e anal são levemente tingidas de vermelho (LIMA, 2006). A nadadeira caudal é pouco furcada, com mancha negra ao longo dos raios medianos (GODOY, 1975). *S. hilarii* é a espécie do gênero com o menor número de escamas na linha lateral e nas séries transversais, entre a linha lateral e a origem da nadadeira dorsal e entre a linha lateral e a inserção da nadadeira pélvica, quando comparada às outras espécies do gênero (LIMA, 2006).

Essa espécie ocorre na bacia do rio Paraná (estados de Goiás, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná), bem como do rio Paraguai (rios Monday e Acary) e na bacia do alto rio São Francisco (estado de Minas Gerais e Distrito Federal) (LIMA, 2006). Também há registros de ocorrência dessa espécie na Argentina, rio Iguazu, abaixo das cataratas e ainda na bacia do rio Jaguaribe, estado do Ceará (FOWLER, 1941; PAIVA, 1959; LÓPEZ et al., 2007) (FIGURA 4). Na bacia do alto rio Paraná, *S. hilarii* ocorre principalmente em rios de médio

porte e ribeirões (GODOY, 1975; AGOSTINHO et al., 2002; OLIVEIRA; GARAVELLO; 2003; BIRINDELLI; GARAVELLO, 2005), preferindo em geral corpos d'água menores que *S. brasiliensis*, o que torna a tabarana uma espécie mais susceptível devido ao maior impacto que esses rios sofrem pela poluição e construção de barragens.

FIGURA 4 – Mapa do leste da América do Sul, mostrando a distribuição de *Salminus hilarii*.



Fonte: LIMA; BRITISKI, 2007.

Agostinho et al. (2007) considera essa espécie como um peixe migrador de grandes distâncias, entretanto, Godoy (1975) e Carolsfeld et al. (2003) caracterizam a espécie como sendo um migrador de curtas distâncias, em geral menos que 100 Km. Em um estudo realizado durante uma piracema, nos meses de outubro e novembro, três tabaranas foram marcadas na Cachoeira de Emas (rio Mogi Guaçu), e recapturadas em distâncias de 51, 87 e 115 km à montante desse ponto (GODOY, 1975).

Aspectos do ciclo reprodutivo de *S. hilarii* estudados em diversas bacias mostraram que o período reprodutivo acontece entre o final da primavera e do verão (GODOY, 1975; TAKAHASHI, 2006), entre os meses de novembro e março. Esse período coincide com as épocas mais quentes e chuvosas, sendo este um padrão adotado por diversas espécies de Characiformes na região sudeste do Brasil (VAZZOLER; MENEZES, 1992). A migração anádroma desses peixes se faz necessária para o desenvolvimento e maturação das gônadas e subsequente desova (GODOY, 1975; AGOSTINHO et al., 2003; HONJI et al.; 2009), que é total nessa espécie (NAKATANI et al., 2001; LIMA, 2006), com liberação de 25.000 a 30.000 ovócitos (GODOY, 1975).

Vários autores já relataram que a tabarana pode ser utilizada como uma boa indicadora ambiental, dado o seu alto grau de seletividade pelo ambiente (necessitam de águas ricas em oxigênio) e por ser uma espécie predadora de topo de cadeia alimentar (CETRA, 2003; LIMA-JÚNIOR, 2003). Apesar de apresentar razoável interesse para a pesca amadora, *S. hilarii* nunca teve nenhuma expressividade na pesca profissional, devido ao seu tamanho e relativa baixa abundância natural (SCHUBART, 1949; MONTEIRO, 1953; GODOY, 1975). Ainda assim, essa espécie corre grande risco de redução de suas populações em função de ações antrópicas, que têm provocado uma série de perturbações no funcionamento dos ecossistemas aquáticos, sem se preocupar com a conservação dos recursos renováveis para uma exploração sustentável.

1.4 Aplicação de marcadores moleculares na genética da conservação de peixes neotropicais

A Biologia da Conservação compreende, em sua maioria, estudos populacionais visando à definição de unidades e prioridades para estratégias de manejo *in situ* ou *ex situ*, bem como o desenvolvimento de modelos demográficos de populações pequenas e/ou fragmentadas (EIZIRIK, 1996). Dentro desse contexto, a Genética da Conservação se caracteriza pelo uso da teoria e técnicas da genética para reduzir os riscos de extinção em espécies ameaçadas. Os estudos nesse campo focam nas consequências que surgem da redução de uma população, uma vez grande e exogâmica, para pequenas unidades onde fatores estocásticos e os efeitos da endogamia são extremamente importantes (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Diversos marcadores moleculares são usados para estimar o nível de variabilidade genética em uma população, bem como determinar estruturação populacional. Os marcadores do tipo microssatélites são unidades nucleotídicas de 1 a 6 pb, repetidas em *tandem* presentes em genomas procarióticos e eucarióticos (TAUTZ; RENZ, 1984; KASHI; SOLLER, 1999), possuem comportamento de herança mendeliana e co-dominância, sendo considerado o marcador molecular com maior conteúdo de informação de polimorfismo (O'REILLY; WRIGHT, 1995; OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, o relativo conservadorismo das sequências flanqueadoras dos locos microssatélites permite a utilização de *primers* heterólogos entre espécies filogeneticamente próximas.

A variabilidade no número de repetições dos microssatélites é responsável pelo alto polimorfismo observado nesses marcadores moleculares (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). O grau de variação de um loco de microssatélite é dependente da taxa de mutação, que varia de 10^{-6} a 10^{-2} eventos por loco, por geração (LI et al, 2002). Essa característica resulta em uma grande quantidade de alelos independentes, fornecendo um alto poder estatístico na detecção de estruturação genética das populações (KALINOWSKI, 2002). Por esses motivos os microssatélites têm sido a classe de marcadores moleculares mais utilizados em estudos de genética da conservação e genética de populações, fornecendo informações valiosas sobre relações de parentesco, eventos de migração e ocorrência de estruturação genética ou panmixia (RICO; RICO; HEWEITT, 1996).

Estudos genético-populacionais em peixes migradores utilizando marcadores microssatélites mostram que essas espécies podem apresentar padrões distintos de estruturação genética, distribuindo-se em grandes e únicas populações panmíticas (REVALDAVES et al., 1997) ou em populações geneticamente diferenciadas (WASKO; GALETTI JR, 2002; HATANAKA; HENRIQUE-SILVA; GALETTI JR, 2006; ARARIPE et al., 2013; FERREIRA et al., 2014; RIBOLLI, 2014, BRAGA-SILVA, 2015).

Outro tipo de marcador molecular muito utilizado em estudos populacionais e filogeográficos são as regiões de DNA mitocondrial (DNAm_t). O DNAm_t é transmitido por herança uniparental (via materna na maioria das espécies) e caracteriza-se por ausência de recombinação. Os marcadores mitocondriais são favoráveis em análises populacionais, quando o objetivo é encontrar respostas sobre a evolução histórica de populações, (CALCAGNOTTO, 2011; BRAGA-SILVA, 2015). As regiões mais conservadas do DNAm_t são utilizadas com sucesso em investigações sobre relações filogenéticas entre diferentes *taxa*

e identificação de subdivisão geográfica entre unidades populacionais (AVISE et al., 1987; EIZIRIK, 1996). Além disso, possuem aplicação em estudo de hibridação (VIANNA et al., 2006), análise da variabilidade genética dentro e entre populações, determinação de parentesco, identificação molecular de espécies, determinação de unidades evolutivamente significativas e unidades de manejo, entre outros (OLIVEIRA et al., 2008; LECOMTE et al., 2009; PURRENHAGE et al., 2009; ZEYL et al., 2009; BITANYL et al., 2011; LUI et al., 2012; ASHIKAGA et al., 2015).

O D-loop é a região controle de replicação do DNAm. Não há sequências codificadoras nessa região, por isso as mutações podem se acumular sem grandes danos ao DNAm. Essa região hipervariável se destaca em estudos populacionais devido à sua elevada taxa de mutação, que é até 100 vezes mais rápida quando comparada com o DNA nuclear (GALTIER et al., 2009; LUI et al., 2012). Por esse motivo, a região D-loop tem sido utilizada em vários estudos de peixes, sendo uma valiosa fonte de informação sobre a variação genética em estudos populacionais (PRIOLI, et al., 2002; AVISE, 2004; LUI et al., 2012; ASHIKAGA et al., 2015).

2 HIPÓTESES

Visto que a espécie é migradora, esperamos encontrar populações homogêneas ou com pouca estruturação entre os períodos amostrados dentro de cada rio. Porém, entre os quatro rios amostrados esperamos encontrar forte estruturação populacional, devido à distância geográfica, além da presença de barreiras naturais e artificiais que impede o fluxo genético entre as populações.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Diante do contexto apresentado, o presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar a estrutura genética de diferentes populações de *S. hilarii*, a fim fornecer dados importantes sobre a diversidade genética para o estabelecimento de estratégias de conservação, como a criação de unidades de manejo e áreas prioritárias para a conservação dessa espécie.

3.2 Objetivos específicos

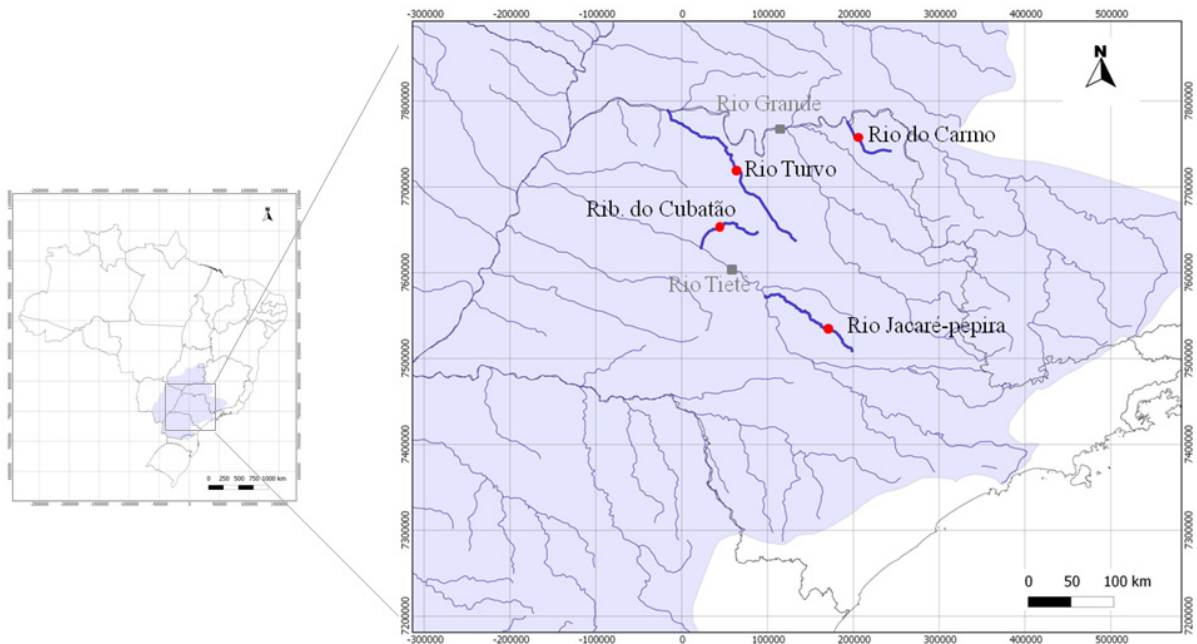
- 1) Estimar a diversidade genética de *S. hilarii* das diferentes populações amostradas na bacia do alto Paraná, com base em marcadores moleculares microsatélite e mitocondrial.
- 2) Determinar a existência de estruturação populacional temporal de *S. hilarii* nos quatro rios amostrados da bacia do alto Paraná.
- 3) Determinar a existência de estruturação populacional por distância de *S. hilarii* na bacia do alto Paraná.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e amostragem

As amostras de *S. hilarii* foram coletadas com o auxílio da Polícia Ambiental do Estado de São Paulo, responsável pela fiscalização de toda região abrangida no estudo. Entre os diversos rios e ribeirões da bacia do alto Paraná, foram amostrados quatro rios localizados no estado de São Paulo. São eles: rio do Carmo, ribeirão do Cubatão, rio Jacaré-pepira e rio Turvo (FIGURA 5). As coletas foram feitas durante o período reprodutivo e fora desse período entre os anos de 2011 e 2015, usando redes de espera e pesca com vara.

FIGURA 5. Rios amostrados na bacia do alto Paraná, localizados no estado de São Paulo.



Fonte: Elaborado no programa QUANTUMGIS.

Após a retirada de um pequeno pedaço da nadadeira caudal (aproximadamente $1,0 \text{ cm}^2$), os peixes foram devolvidos ao rio. Todas as amostras de tecido foram imediatamente preservadas em álcool absoluto e posteriormente depositadas no Banco de Tecidos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, SP.

4.1.1 Rio do Carmo

O rio do Carmo está localizado no nordeste do estado de São Paulo e pertence à bacia do rio Grande. Ele nasce no município de Cristais Paulista, passa pelos municípios de Jeriquara, Ribeirão Corrente, Ituverava, Miguelópolis e Aramina, onde se torna afluente do rio Grande. Percorre nesse trajeto uma distância de aproximadamente 83 quilômetros. Esse rio possui apenas dois afluentes, ribeirão da Bandeira e ribeirão Ponte Nova, ambos na margem direita. O rio do Carmo deságua entre as barragens das represas Volta Grande e Porto Colômbia, esse trecho possui três tributários na margem direita (estado de Minas Gerais) e apenas o rio do Carmo na margem esquerda (estado de São Paulo). As coletas foram realizadas na cidade de Ituverava, SP (TABELA 1).

TABELA 1. Número de indivíduos de *S. hilarii* amostrados no rio do Carmo, Ituverava – SP.

Rio	Coleta	Período	Número de amostras	Total
Rio do Carmo (20° 9'52.87"S 47°52'42.99"O)	Dezembro/2011	Reprodutivo	06	09
	Outubro/2013	Reprodutivo	03	

4.1.2 Ribeirão do Cubatão ou Barra Mansa

Sua nascente está no município paulista de Elisário, localizado na microrregião de Catanduba, noroeste do estado de São Paulo. O ribeirão do Cubatão deságua no rio Tietê entre as represas Bariri e Promissão, entre os municípios de Sales e Adolfo. Os peixes desse ribeirão foram coletados fora do período reprodutivo (TABELA 2), na cidade de Potirendaba, SP.

TABELA 2. Número de indivíduos de *S. hilarii* amostrados no ribeirão do Cubatão, Potirendaba – SP.

Rio	Coleta	Período	Número de amostras	Total
Rio Cubatão (21°10'25.12"S 49°23'55.08"O)	Abril/2012	Não reprodutivo	08	20
	Setembro/2012	Não reprodutivo	12	

4.1.3 Rio Jacaré-pepira

Pertencente à bacia do rio Tietê, o rio Jacaré-pepira nasce entre os municípios de Brotas e São Pedro na Serra de Itaqueri a uma altitude de 960 metros sobre o nível do mar. Ele deságua no rio Tietê na represa de Ibitinga, no município de mesmo nome e tem aproximadamente 174 quilômetros de extensão, ocupando uma área de 2.612 km². O rio Tietê possui poucos tributários entre as barragens das represas de Bariri e Ibitinga, sendo três na margem esquerda e dois na margem direita, sendo um deles o rio Jacaré-pepira. Esse é um dos poucos rios do estado de São Paulo que não possui poluição industrial. A recuperação e preservação das matas ciliares fazem com que seja uma reserva da biodiversidade e isso tem possibilitado vários estudos na área de meio ambiente. Além disso, esse rio é muito utilizado para a prática de esportes náuticos e de aventura, sendo fator de desenvolvimento regional por seu enorme potencial turístico. Nessa localidade foram coletados 34 indivíduos em cinco períodos distintos, conforme descrito na TABELA 3.

TABELA 3. Número de indivíduos de *S. hilarii* amostrados no rio Jacaré-pepira, Brotas – SP.

Rio	Coleta	Período	Número de amostras	Total
	Abril/2012	Não reprodutivo	10	
Rio Jacaré-pepira	Novembro/2012	Reprodutivo	05	
(22°15'54.13"S	Janeiro/2013	Reprodutivo	08	34
48°13'44.85"O)	Outubro/2013	Reprodutivo	06	
	Outubro/2014	Reprodutivo	05	

4.1.4 Rio Turvo

O rio Turvo nasce no município de Monte Alto, situado no estado de São Paulo, e se torna afluente do rio Grande no município de Cardoso, também localizado em São Paulo. O rio percorre nesse trajeto uma distância aproximada de 267 Km. Seus principais afluentes são: rio da Onça, rio Preto, rio São Domingos e rio da Cachoeirinha. Esse rio deságua entre as barragens das represas de Marimbondo e Água Vermelha e nesse trecho possui três tributários em cada margem.

Atualmente, devido à interferência antrópica, pouco restou da vegetação original que compunha a região da bacia do rio Grande na porção localizada no estado de São Paulo, a qual o rio Turvo pertence. A bacia do rio Turvo apresenta problemas ambientais de

degradação dos recursos hídricos superficiais associados ao uso e ocupação inadequados do solo.

As amostras foram coletadas a jusante do rio São Domingos, num trecho de aproximadamente 100 km. Foram coletados 71 indivíduos em seis períodos distintos, conforme descrito na (TABELA 4).

TABELA 4 - Número de indivíduos de *S. hilarii* amostrados no rio Turvo.

Rio	Coleta	Período	Número de amostras	Total
Rio Turvo	Out/2011	Reprodutivo	05	71
	Fev/2012	Reprodutivo	05	
	Nov/2012	Reprodutivo	07	
	Out/2013	Reprodutivo	16	
	Nov/2014	Reprodutivo	24	
	Fev/2015	Reprodutivo	14	

4.2 Extração e quantificação de DNA

A extração do DNA genômico total foi realizada seguindo o método descrito por Aljanabi e Martinez (1997), com pequenas adaptações. Um pedaço do tecido de aproximadamente 1,0 cm² foi submetido à digestão em solução de lise (contendo 0,4 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0; 40 µL de SDS 20 % e 8 µL de proteinase K 20 mg/mL - volume final da solução de 400 µL) posterior adição de NaCl 6 M e precipitação com etanol absoluto. O DNA foi ressuspendido em 50µl de água deionizada estéril e tratado com 5 µL de RNase (100 µg/mL). A integridade e concentração do DNA obtido foram avaliadas mediante comparação com o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) como parâmetro de quantificação. Para tanto, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 % imerso em tampão TBE 1x (Tris-Base, Ácido Bórico, EDTA) e coradas com Gel Red™. As amostras foram padronizadas em alíquotas de 50 ng e estocadas a -20 °C para posteriormente serem testadas em reações em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction).

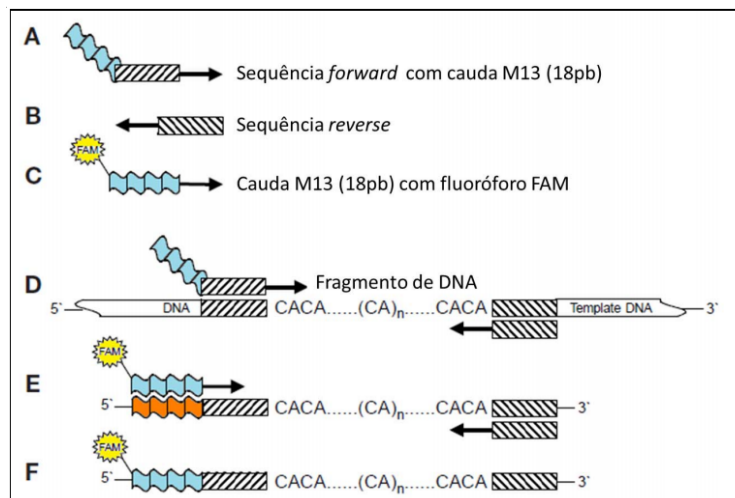
4.3 Amplificação dos locos de microssatélites e genotipagem

Utilizamos nas análises nove locos polimórficos de microssatélites desenvolvidos por Rossini *et al.* (2011) (Tabela 5) para a espécie *S. franciscanus*, e validados em *S. hilarii* (Nunes, 2010) e seis locos espécie-específicos (SILVA; HILSDORF, 2011) (TABELA 6). As reações de amplificação foram feitas com marcação fluorescente M13 segundo o protocolo de Schuelke (2000). O método consiste na adição de uma cauda universal de 18 bases (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) na porção 5' de um dos *primers* (*Forward* ou *Reverse*) (FIGURA 6). Essa cauda serve de sítio de hibridização para um iniciador universal M13 (TGT AAA ACG ACG GCC AGT), o qual é marcado com fluorescência. Desse modo, o *primer* marcado com fluorescência, que possui alto custo, pode ser utilizado para outros pares de *primers* de diversos locos, pois sua função é apenas inserir a fluorescência ao fragmento previamente amplificado. O volume final de cada reação foi 10 μL , contendo 5 μL de *GoTaq® Colorless Master Mix 2X* (Promega); 50 ng de DNA; 1 μL do *primer* universal M13 com fluorescência FAM, TET ou HEX, à concentração de 8 pmol/ μL ; 1 μL do *primer* sem a cauda M13 à 8 pmol/ μL ; 1 μL do *primer* com a cauda M13 a 2 pmol/ μL ; 1 μL de água deionizada estéril.

O programa para a amplificação dos locos heterólogos realizado em termociclador, consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 45 segundos à temperatura de anelamento específica descritos para cada par de *primer* (Tabela 5), 72°C por 45 segundos; mais 10 ciclos adicionais iniciando a 94°C por 30 segundos, 45 segundos à temperatura de anelamento do *primer* M13 marcado (53°C), 45 segundos a 72°C; finalizando na temperatura de extensão de 72°C por 10 minutos. Para os locos espécie-específicos, foi usado o programa de amplificação iniciando com desnaturação a 94°C por 5 minutos, 3 ciclos de 94°C por 30 segundos, seguido de 60°C por 45 segundos (temperatura de anelamento) e , por fim, 72°C por 45 segundos. Esses 3 ciclos foram repetidos com diminuição de 1°C a cada ciclo até chegar na temperatura de anelamento de 50°C. Além disso, foram feitos mais 10 ciclos adicionais para o anelamento do *primer* M13 nos fragmentos amplificados. Os fragmentos amplificados foram genotipados em sequenciador automático MEGABACE 1000 (GE Healthcare Life Science) e a leitura dos alelos foi realizada no do programa *Fragment Profiler Software Suite v1.2* (GE Healthcare Life

Science) com ET-ROX 550-R como tamanho padrão, onde foi possível a identificação dos genótipos de cada loco para os indivíduos amostrados.

FIGURA 6 – Esquema de reação de amplificação com o uso da cauda universal M13. A. *Primer forward* acrescido da cauda M13. B. *Primer reverse*. C. Cauda M13 marcada com fluoróforo. D. Anelamento dos *primers* específicos às regiões flanqueadoras do microssatélite, com posterior amplificação. E. Anelamento da cauda M13 na sequência complementar. F. DNA microssatélite amplificado adicionado da cauda M13 marcada com fluoróforo.



Fonte: Adaptado de Schuelke (2000).

TABELA 5 - Características dos nove locos heterólogos (ROSSINI et al., 2011).

Loco	Unidade Repetitiva (motif)	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Acesso Genbank
Sfra 02	(GT) ₁₈	F: GCAGTCCTCACTACGTATAGT R: CTCGCTTACAACCTGAC	258	60	HQ317313
Sfra 03	(CA) ₁₄	F: GCATAGGAGCATTCACTC R: GACACCCAGACTCCAAAC	164	58	HQ317314
Sfra 04	(AC) ₆ tctcgctcaca(CACG) ₄	F: ATTTAGCTGTTCCGGCTGA R: CGGCTTATGTGACGTAGAG	153	58	HQ317315
Sfra 05	(TCTG) ₆	F: GTTCAGGACGTTAGCTAGC R: GTCGTCGACATTTGGGTA	380	62	HQ317316
Sfra 10	(CTGT) ₃ ccgccc(GTCT) ₃	F: CTGAACGCAGCTGTCTG R: CCCTGACCTAACCAACG	257	60	HQ317320
Sfra 13	(TC) ₁₇	F: GACGTTCTGCCTTGAATG R: GACGTCATGTCAGGTTTCA	236	60	HQ317323
Sfra 14	(CT) ₁₃ (CA) ₈	F: GAAATCTCCAAGCCTGAG R: GAAAGAAGCTGTTTCTCAG	232	56	HQ317324
Sfra 15	(GT) ₃₁ (GA) ₁₀	F: AGATTCCCCTCAGACCA R: CAAATGAGCTTGCCCTTAC	232	62	HQ317325
Sfra 18	(GACA) ₆ gaa(AGAC) ₄	F: GAACAGCAACAACGGACA R: CATCCGAGGTCAGAGGTAG	175	58	HQ317326

TABELA 6 - Características dos seis locos espécie-específicos (SILVA; HILSDORF, 2011).

Loco	Unidade Repetitiva (motif)	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Acesso Genbank
Sh 01	(GT) ₂₆	F: TGGTTCTAAGTCTGGATAAAGG R: ACACACACACAAACTCACAAAG	173–211	HQ533133
Sh 05	(TG) ₁₅	F: CTATCTGATACGCCCCGGTC R: CTCGTCCAGGGTCATCTCCTT	168–204	HQ533134
Sh 12	(CA) ₁₃	F: GTTATACTGTGGGGTTAACATG R: GATGCTACCAAGGGTTCAGT	221–253	HQ533136
Sh 49	(TG) ₁₀	F: TCTACAGGGACTAGACAAGC R: GAGATGTGTTCAGAGAGCTG	133–147	HQ533138
Sh 56	(TG) _{4ta} (TG) ₂₅	F: CTGTTATTATTATTGCTTTGTGC R: AGTGGGTGTCAAACCTTAATCA	132–152	HQ533139
Sh 85	(AC) ₂₇	F: TGCCCCACTTCTGACTGAAT R: TGGGTAATTGAAGATGCAGAAA	211–237	HQ533141

4.4 Amplificação do D-loop, purificação e sequenciamento

Para a amplificação da região de controle do DNA mitocondrial, foram utilizados os primers L D-loop 5'- AGA GCG TCG GTC TTG TAA ACC - 3' (CRONIN et al, 1993) e H16498 5'- CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG - 3' (MEYER; KOCHER; BASASIBWAKI, 1990). A PCR foi realizada com o uso da *GoTaq® Colorless Master Mix 2X* (Promega), no qual para um volume final de 20 µL foi usado 10 µL de *GoTaq®*, 50 ng de DNA, 0,1 µM de cada *primer* e 7 µL de água deionizada estéril. Os ciclos foram programados para uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 54°C por 15 segundos, 72°C por 30 segundos, seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Antes de serem sequenciadas, as amostras foram purificadas com Polietileno Glicol 8000 (PEG 8000 20% NaCl 2,5M) (LIS, 1980), com a finalidade de retirar os reagentes que restaram da PCR, deixando apenas o fragmento amplificado para ser sequenciado. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático ABI3730XL Applied Biosystems, (Macrogen Inc, Seoul, Korea).

4.5 Análise estatística dos dados

4.5.1 Microssatélites

Primeiramente analisamos a presença de estruturação nas populações amostradas. Para isso calculamos o coeficiente de fixação de Wright (F_{ST}), para verificar a

diferenciação genética entre as populações definidas *a priori*. O F_{ST} é definido como a correlação entre gametas tirados ao acaso da mesma subpopulação em relação ao total (WRIGHT, 1965; 1978). Também calculamos o R_{ST} de Slatkin (SLATKIN, 1995), um análogo de F_{ST} de Wright adaptado para microssatélites, assumindo um modelo de mutação por passos de alta velocidade e a análise de Variância Molecular (AMOVA), que verifica a partição da variância entre e dentro das populações. As três análises foram realizadas usando o programa ARLEQUIN (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Estimativas de diferenciação genética de Jost (D_{est}), realizada entre pares de populações amostrais, foram obtidas por meio do programa SMOGD v1.2.5 (CRAWFORD, 2010). Esse cálculo foi proposto por Jost (2008), pois, segundo o autor, quando se usa locos muito polimórficos ocorre uma saturação nesse índice, o que o impede de representar a real diferenciação. Essa saturação ocorre porque os três componentes da estatística F estão interligados (variação local, variação entre populações e variação total). Dessa forma, se a variação local aumenta devido ao polimorfismo dos locos utilizados, conseqüentemente a variação entre populações diminui.

Uma análise de agrupamento bayesiana foi realizada no *software* STRUCTURE 3.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) para inferir, sem informação *a priori* da origem dos indivíduos, o número mais provável de subpopulações. Nessa análise foi estimado o número de populações (K) utilizando o modelo *admixture*, que é apropriado para populações que apresentaram ou ainda apresentam fluxo alélico em taxas suficientes para que os indivíduos possam ter ancestrais de mais de uma população. Para cada valor de K (1 a 10) foram realizadas seis corridas independentes, e para cada uma delas foram realizadas 800 mil gerações de Cadeia de Markov-Monte Carlo (MCMC) e 200 mil gerações de *burn-in*. O número real de populações foi obtido de acordo com o método de Pritchard et al. (2000), segundo o qual devemos escolher o valor de K que maximize a probabilidade de os dados pertencerem ao número estimado de populações, e pela correção de Evanno et al. (2005) (DeltaK), que se baseia na taxa de mudança da probabilidade *a posteriori* dos dados entre sucessivos valores de K . Ambas estimativas foram determinadas por meio do programa STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012).

Uma análise fatorial de correspondência (AFC) foi realizada no programa GENETIX (MARTIEN; GIVENS; ARCHER, 2007). A AFC nos permite visualizar a distribuição dos indivíduos em um espaço definido pela similaridade de seus estados alélicos por meio de um gráfico.

Após a verificação da estruturação populacional realizamos as análises de diversidade genética de cada população amostral. Para estimar a variabilidade intrapopulacional foi determinado o número de alelos por loco, os valores da heterozigosidade esperada e observada (NEI, 1987), o número de alelos privados e riqueza alélica. Os três primeiros parâmetros foram obtidos no programa GENALEX 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) e os dois últimos foram calculados no FSTAT 2.9 (GOUDET, 1995), juntamente com o cálculo do coeficiente de endocruzamento (FIS) (WRIGHT, 1951; 1965), com os valores de p para o excesso (P_L) e para o déficit de heterozigotos (P_S).

O programa GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995) foi usado para determinar eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, que tem como hipótese nula a união aleatória dos gametas. A ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos em cada população foi testada utilizando-se o teste exato (teste G) também por meio do GENEPOP. Para verificar a presença de alelos nulos e *stutters* foi utilizado o programa MICRO-CHECKER (OOSTERHOUT et al., 2004). A correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989) foi utilizada para confirmar as significâncias dos resultados encontrados em todos os testes realizados, corrigindo os intervalos de confiança.

Para verificar a existência de eventos demográficos recentes, como redução no tamanho efetivo populacional, foi utilizado o programa BOTTLENECK (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999). Nesse tipo de análise, é estimado a heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) para cada loco. A significância foi obtida pelo teste de Wilcoxon, mais indicado para amostras avaliadas com menos de 20 locos, considerando o modelo de mutação *two phase* (TPM), estabelecido com 30% para o modelo *infinite alleles* (IAM) e 70% para o *stepwise mutation* (SMM). O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi avaliado por meio do *software* CERVUS (KALINOWSKI et al., 2007)

4.5.2 D-loop

As sequências obtidas foram alinhadas e editadas no programa GENEIOUS (DRUMMOND et al., 2010). A AMOVA e o índice de fixação, que indica a diferenciação genética entre populações independente ao grupo que pertence (F_{ST}), foram calculados no programa ARLEQUIN (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A construção das árvores filogenéticas utilizando os métodos de distâncias Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança foram

estabelecidas no programa MEGA v.5.2 (TAMURA et al., 2007). Essas análises incluíram como grupo externo *Salminus franciscanus*. O modelo mutacional que explica de forma mais adequada as substituições encontradas foi determinado pelo programa J-MODEL TEST 2.1.3 (DARRIBA et al., 2012). Os modelos mutacionais foram definidos utilizando o critério Kimura 2-parâmetros.

O programa DnaSP 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009) foi utilizado para obtenção do número de sítios polimórficos, número de haplótipos e valores da diversidade haplotípica e nucleotídica, além dos testes de neutralidade. Os dados referentes a desvios da premissa de neutralidade seletiva foram estimados pelo teste D de Tajima (TAJIMA, 1989). Esse teste distingue sequências de DNA que evoluem aleatoriamente (seleção neutra) daquelas que evoluem por processos não aleatórios, por meio de dois estimadores de teta (um que utiliza os sítios segregantes [S] e outro que utiliza o número médio de diferenças nucleotídicas [k]). Os valores de D menores que zero (negativos) sugerem expansão populacional ou seleção purificadora, e valores maiores que zero (positivos) sugerem um recente *bottleneck* na população ou seleção balanceadora (HOLSINGER, 2008). Além desse, também foram realizados os testes F* e D* (FU; LI, 1993) e Fs (FU, 1997), disponíveis no programa DnaSP. Como os testes de neutralidade de D* e F* são mais sensíveis à seleção em relação ao Fs, esses podem auxiliar na distinção entre expansão populacional e *background selection*.

Por fim, construímos redes haplotípicas Median-Joining (MJ) estabelecidas utilizando o software NETWORK 4.6.1 (BANDELDT; FORSTER; RÖHL, 1999).

5 RESULTADOS

5.1 Rio do Carmo

Iniciamos as análises dos dados verificando a ocorrência de diferenciação genética populacional no rio do Carmo, usando dados obtidos por meio de 15 locos de microssatélites. O índice F_{ST} apresentou valor baixo e valor de P não significativo, indicando ausência de diferenciação genética entre as amostragens. O mesmo resultado foi observado para o R_{ST} . O valor de D_{est} , que varia de 0 a 1, também não foi indicativo de diferenciação populacional por estar mais próximo a zero ($D_{est} = 0,0404$) (TABELA 7).

TABELA 7 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de F_{ST} , R_{ST} e de D_{est} .

	F_{ST} par-a-par	R_{ST}	D_{est}
Dez/2011 – Out/2013	0,028 ($P = 0,306$)	0,0388 ($P = 0,360$)	0,0404

Nível de significância $\alpha = 0,0500$.

A Análise de Variância Molecular apresentou variação entre e dentro das populações amostrais de 4,61 e 95,39 %, respectivamente. O valor de F_{ST} global foi significativo (TABELA 8).

TABELA 8 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.

Fonte da Variação	Porcentagem de Variação	Valor de P - F_{ST}
Entre populações	4,61 %	--
Dentro de populações	95,39 %	--
F_{ST} -global	0,046	0,00*

Nível de significância $\alpha = 0,0500$.

O valor de K dado pelo do método de Pritchard et al. (2000) foi igual a 1 (um), esse valor representa o número mais provável de populações. Por esse método escolhe-se o K que maximiza o valor de $\ln P(K)$ e que possua a menor variância. (FIGURA 7). A análise de atribuição bayesiana realizada no programa STRUCTURE, sem informação *a priori* sobre a origem geográfica das populações, nos permite identificar claramente que os indivíduos do rio

do Carmo compõem uma única população, como podemos observar no gráfico de barras (FIGURA 8), onde todos os indivíduos têm igual probabilidade de pertencer a qualquer das populações.

FIGURA 7 - Estimativa do número real de populações de *S. hilarii* de acordo com o método de Pritchard (2000) evidenciando $k=1$.

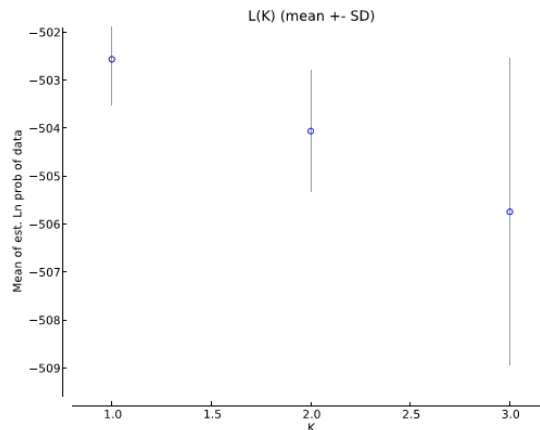
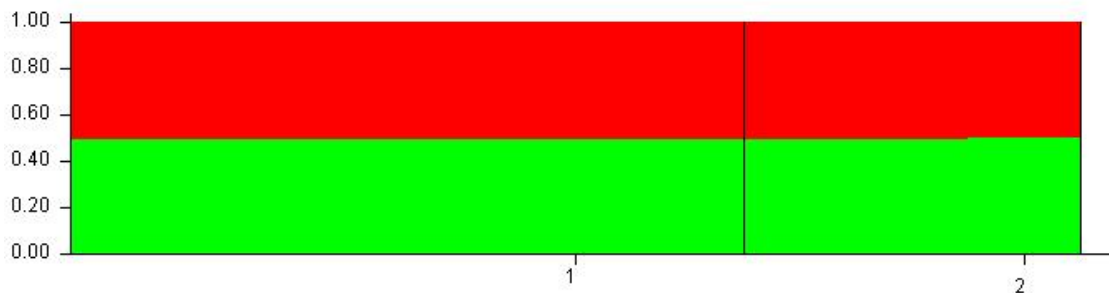


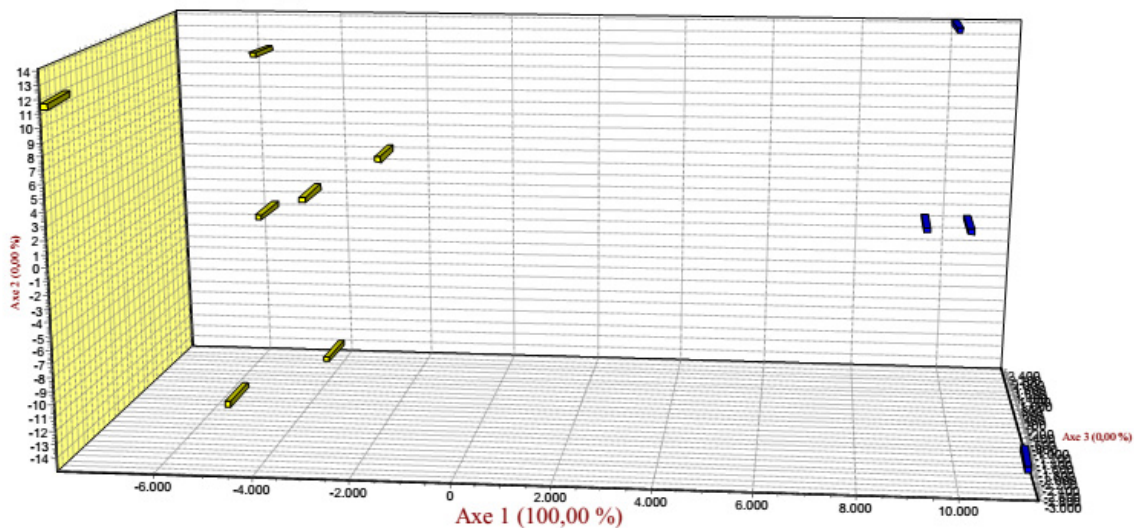
FIGURA 8 - Gráfico da atribuição dos indivíduos de *S. hilarii* obtido pelo Structure com $k = 2$, sem informação *a priori*, representando a não diferenciação das populações no rio do Carmo. Os números laterais indicam a probabilidade de o indivíduo pertencer à determinada população. 1: Dezembro/2011, 2: Outubro/2013.



Discordando dos outros resultados das análises de diferenciação realizadas, exceto F_{ST} -global, a análise fatorial de correspondência (AFC) separou em dois grupos os indivíduos do rio do Carmo, de acordo com a data de amostragem (FIGURA 9). Como essa análise faz a distribuição dos indivíduos em um espaço definido pela similaridade de seus estados alélicos, é possível que haja uma maior similaridade dos genótipos dentro dos grupos que entre eles. Esse resultado também foi observado na AMOVA, onde F_{ST} global foi

significativo para diferenciação populacional. Apesar disso, outros fatores levam a acreditar que não haja estruturação populacional nesse rio.

FIGURA 9 - Representação gráfica da análise fatorial de correspondência considerando duas populações prévias de *S. hilarii*.



População Dezembro/2011 (amarelo), População Outubro/2013 (azul).

A não diferenciação genética entre os dois períodos amostrados no rio do Carmo sugere a ocorrência de uma população homogênea nesse rio. Tal resultado pode ser devido ao número de amostras reduzidas coletada nesse rio. O baixo número amostral é devido às dificuldades encontradas para a captura de *S. hilarii* que apresenta um comportamento muito apreciado por pescadores esportivos de bravura e resistência ao ser fígado, conseguindo escapar da isca. Além disso, Godoy (1975) retrata que *S. hilarii* pode percorrer cerca de 100 quilômetros durante a migração reprodutiva. A ausência de estruturação encontrada no rio do Carmo pode ser explicada pela sua extensão de apenas 83 quilômetros, que possibilita o fluxo contínuo desses peixes em toda a extensão do rio. Ainda, o número amostral reduzido apresenta dificuldades para as análises estatísticas (ROFF; BENTZEN, 1989), uma vez que amostras muito pequenas podem levar a resultados imprecisos.

Diante da ausência de estruturação, seguimos com as análises de diversidade genética considerando todos os indivíduos amostrados como pertencentes a uma única população.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) calculados para os 15 locos variaram de 0,434 (Sfra 10) a 0,916 (Sfra 15). Apenas o loco Sfra 10 apresentou valor inferior a 0,5 sendo considerado com pouco conteúdo de informação polimórfica. Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os pares de locos na população do rio do Carmo. Apenas o loco Sh 05 apresentou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (TABELA 9). As análises no *software* MICRO-CHECKER indicaram que esse loco apresentou frequência elevada de alelos nulos.

Para caracterizar a diversidade genética, foi estimado o número de alelos (Na), número efetivo de alelos (Ne), a riqueza alélica (Ra) e a heterozigosidade esperada (He). O Na variou de quatro (Sfra 03) a 14 (Sfra 15), com média de 7,73, enquanto que o Ne variou de 1,84 (Sfra 10) a 12,8 (Sfra 15), com média de 5,32. Os valores de Ra, baseado em oito indivíduos diplóides, variaram de quatro (Sfra 03) a 14 (Sfra 15), com média de 7,38, e os valores de He de 0,457 (Sfra 10) a 0,922 (Sfra 15). A diversidade genética encontrada variou de 0,486 (Sfra 10) a 0,991 (Sfra 15) (TABELA 9).

TABELA 9 - Dados de diversidade genética de *S. hilarii* amostrados no rio do Carmo.

Loco	N	Na	Ne	He	Ho	P _{HW}	Dg	F _{IS}	P _L	P _S	Ra	PIC
Sh01	9	6	4,500	0,778	0,444	0,0077	0,847	0,475	0,013	1,000	5,778	0,745
Sh05	9	10	6,231	0,840	0,444	0,0002*	0,917	0,515	0,003	1,000	9,216	0,822
Sh12	9	8	5,586	0,821	0,667	0,0120	0,882	0,244	0,103	0,990	7,549	0,798
Sh49	8	8	4,741	0,789	0,625	0,0141	0,857	0,271	0,093	0,996	8,000	0,766
Sh56	9	7	2,160	0,537	0,667	1,0000	0,563	-0,185	1,000	0,256	6,333	0,520
Sh85	9	12	10,12	0,901	1,000	1,0000	0,951	-0,051	1,000	0,663	11,19	0,893
Sfra 02	9	10	8,100	0,877	0,667	0,0145	0,944	0,294	0,020	1,000	9,431	0,864
Sfra 03	8	4	2,909	0,656	0,750	0,7819	0,696	-0,077	0,740	0,603	4,000	0,605
Sfra 04	9	5	2,893	0,654	0,778	0,8577	0,688	-0,131	0,836	0,466	4,771	0,603
Sfra 05	9	5	3,306	0,698	0,778	0,7576	0,736	-0,057	0,773	0,500	4,876	0,651
Sfra 10	9	5	1,841	0,457	0,444	0,5278	0,486	0,086	0,496	0,893	4,660	0,434
Sfra 13	9	9	6,480	0,846	0,889	0,6561	0,896	0,008	0,656	0,773	8,536	0,829
Sfra 14	9	8	5,786	0,827	0,778	0,3322	0,882	0,118	0,300	0,913	7,647	0,806
Sfra 15	8	14	12,80	0,922	0,875	0,1330	0,991	0,117	0,143	0,990	14,00	0,916
Sfra 18	9	5	2,382	0,580	0,556	0,0716	0,618	0,101	0,420	0,896	4,771	0,544
Média	8,8	7,73	5,323	0,745	0,691	--	0,796	0,1152	--	--	7,384	0,719

N: número amostral, Na: número de alelos, Ne: número efetivo de alelos, H_e: heterozigosidade esperada, H_o: heterozigosidade observada, P_{HW}: desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0,003$ (ajustado com a correção de Bonferroni), Dg: diversidade genética, F_{IS}: coeficiente de endocruzamento, P_L: valores de P para o déficit de heterozigotos, P_S: valores de P para o excesso de heterozigotos, Ra: riqueza alélica, PIC: conteúdo de informação polimórfica. * valores significantes.

Não encontramos evidências de gargalo populacional, como podemos observar na TABELA 10. Uma possível explicação para o resultado encontrado é que, apesar de ser o único afluente da margem direita do rio Grande entre duas barragens, esse rio possui outros tributários que podem auxiliar a manter os estoques genéticos desses peixes.

TABELA 10 - Valores de P para o teste de excesso de heterozigotos de *S. hilarii* no rio do Carmo, dados obtidos pelo programa Bottleneck.

	Modelos		
	IAM	TPM	SMM
Rio do Carmo	0,511	0,532	0,915

IAM Infinite Allele Model; *TPM* Two Phase Model; *SMM* Stepwise Mutation Model. $P > 0,05$

Para as análises utilizando o marcador molecular D-loop, analisamos sete indivíduos (TABELA 11). O cálculo de índice de fixação (F_{st}) par-a-par não apresentou diferenciação entre os períodos amostrais ($P \geq 0,05$) (TABELA 12). A porcentagem de diferenciação, dada pela AMOVA, entre as amostragens foi de 7,34 % e dentro foi de 92,66 %, com F_{st} -global de 0,073 e P não significativo ($P \geq 0,05$) (TABELA 13).

TABELA 11 - Número de indivíduos de *S. hilarii* utilizados nas análises da Região Controle (D-loop).

Período	Número de amostras
Dezembro/2011_R	04
Outubro/2013_R	03
Total	07

TABELA 12 - Estimativas F_{ST} par-a-par e valores de P de F_{ST} .

	Dez/2011 – Out/2013
P de F_{ST}	0,414
F_{ST} par-a-par	0,073

Nível de significância $\alpha = 0,0500$

TABELA 13 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.

Fonte da Variação	Porcentagem de Variação	Valor de P - F_{ST}
Entre populações	7,34 %	--
Dentro de populações	92,66 %	--
F_{ST} -global	0,073	0,408

Nível de significância $\alpha = 0,0500$.

Diante da ausência de estruturação, seguimos as análises considerando todos os indivíduos pertencendo a uma única população. Foram analisados 557 pb e identificados três sítios polimórficos, resultando em três haplótipos com diversidade haplotípica de 0,525 e diversidade nucleotídica de 0,0025. Os testes de neutralidade resultaram em valores negativos ($P < 0,10$), sugerindo que essa população provavelmente passou por um evento de expansão populacional (TABELA 14).

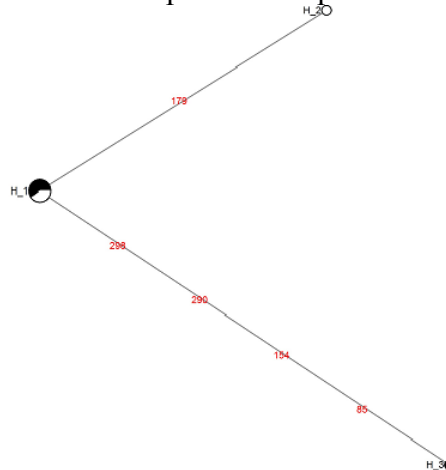
TABELA 14 - Diversidade haplotípica e Teste de Neutralidade de *S.hilarii*.

	Diversidade genética					Teste de neutralidade			
	N	H	K	Hd	Pi	Tajima's D	D*	F*	Fs de Fu
Rio do Carmo	07	03	1,429	0,525	0,0025	-1,486	-1,566	-1,683	0,668

N: tamanho da amostra, H: número de haplótipos, K: média do número de diferenças, Hd: diversidade haplotípica, Pi: diversidade nucleotídica. Nível de significância $\alpha = 0,0500$.

Podemos observar na rede haplotípica o compartilhamento de haplótipos entre os indivíduos amostrados nos dois períodos, corroborando a ausência de estruturação entre estes (FIGURA 10). A árvore de distância construída no programa MEGA (Neighbor-Joining, Modelo de Kimura 2-parâmetros) (FIGURA 11), também não evidenciou uma estruturação, apresentando baixos valores de suporte. Assim como árvore de Máxima Verossimilhança (FIGURA 12).

FIGURA 10 - Rede haplotípica de *S. hilarii* a partir de sequências de D-loop.



Haplótipos das populações Dezembro/2011 (preto) e Outubro/2013 (branco). O tamanho dos círculos é proporcional ao número de háplótipos compartilhados e os números em vermelho representam substituições nucleotídicas.

FIGURA 11 - Árvore de distância de *S. hilarii* construída a partir de seqüências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Neighbor-Joining.

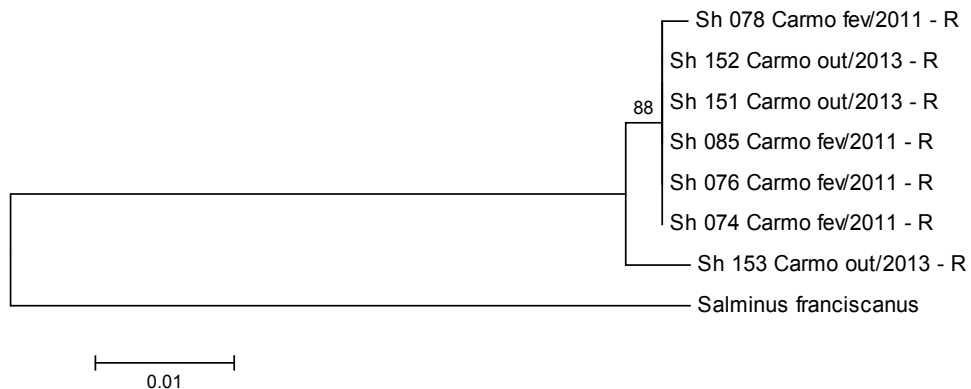
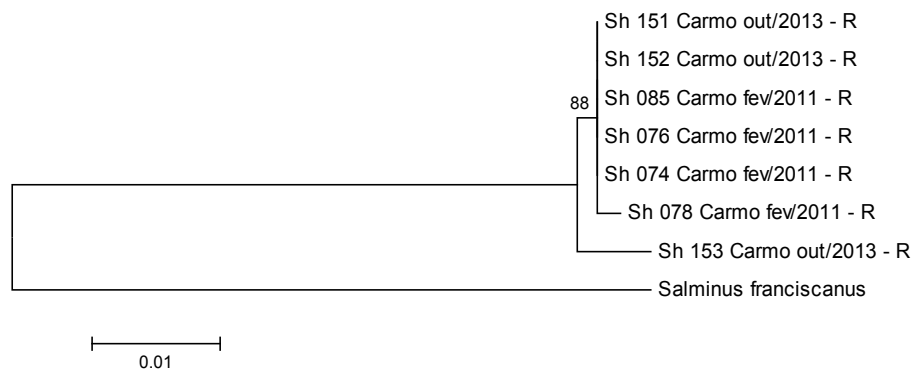


FIGURA 12 - Árvore filogenética de *S. hilarii* construída a partir de seqüências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Máxima Verossimilhança.



O D-loop tem sido bastante usado em estudos populacionais por ser uma valiosa fonte de variação genética e se destaca à sua elevada taxa de mutação, que é até 100 vezes mais rápida quando comparada com o DNA nuclear (GALTIER et al., 2009; LUI et al, 2012). Porém essa taxa é mais lenta comparada aos microssatélites. Dessa forma é uma ferramenta que permite revelar eventos populacionais mais antigos, enquanto os microssatélites geram dados sobre a ocorrência de eventos mais recentes.

Nos resultados gerados pelas análises do D-loop encontramos a ausência de diferenciação genética entre as amostragens do rio do Carmo, confirmando os resultados obtidos por meio dos microssatélites.

5.2 Ribeirão do Cubatão ou Barra Mansa

Assim como nas análises do rio do Carmo, iniciamos as análises dos dados verificando a ocorrência de diferenciação genética populacional no ribeirão do Cubatão, usando 15 locos de microssatélites.

Assim como as estimativas de diferenciação genética de Jost (D_{est}), que é mais indicado quando se usa locos muito polimórficos, os valores de R_{ST} de Slatkin, um análogo de F_{ST} de Wright adaptado para microssatélites (SLATKIN, 1995), não foram significativos para diferenciação populacional. Esse mesmo resultado foi encontrado para o coeficiente de fixação de Wright (F_{ST}), definido como a correlação entre gametas amostrados aleatoriamente de dentro de alguma subpopulação em relação à população total e relacionado à variância na frequência alélica entre populações (HOLSINGER; WEIR, 2009) (TABELA 15).

TABELA 15 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de F_{ST} , R_{ST} e de D_{est} .

	F_{ST} par-a-par	R_{ST}	D_{est}
Abril/2012 - Setembro/2012	0,0163 ($P = 0,18$)	0.03412 ($P = 0,30$)	0,0093

Nível de significância = 0,0500.

A Análise de Variância Molecular apresentou uma baixa porcentagem de variação entre as populações amostrais (TABELA 16).

TABELA 16 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.

Fonte da Variação	Porcentagem de Variação	Valor de P - F_{ST}
Entre populações	1,64 %	--
Dentro de populações	98,36 %	--
F_{ST} -global	0,009	0,991

Nível de significância = 0,0500.

Concordando com as demais análises, o valor de K dado pelo do método de Pritchard et al. (2000) foi igual a 1 (um), esse valor representa o número mais provável de populações. Por esse método escolhe-se o K que maximiza o valor de $\text{LnP}(K)$ e que possua a menor variância (TABELA 15). A análise de atribuição bayesiana realizada no programa STRUCTURE, sem informação *a priori*, nos permite identificar claramente que os indivíduos do rio do Cubatão compõem uma única população, como podemos observar no gráfico de barras (FIGURA 14), onde todos os indivíduos têm igual probabilidade de pertencer a qualquer das populações.

FIGURA 13 - Estimativa do número de populações de acordo com o método de Pritchard (2000) evidenciando $k=1$.

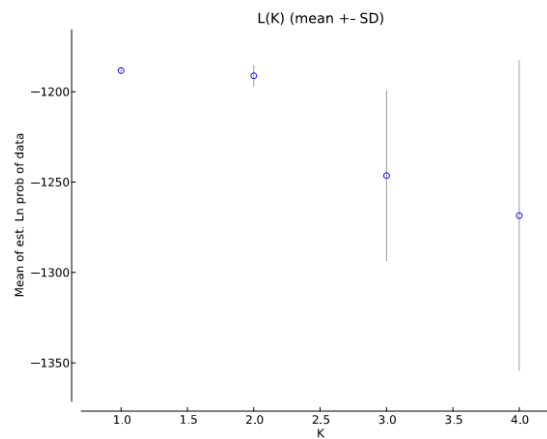
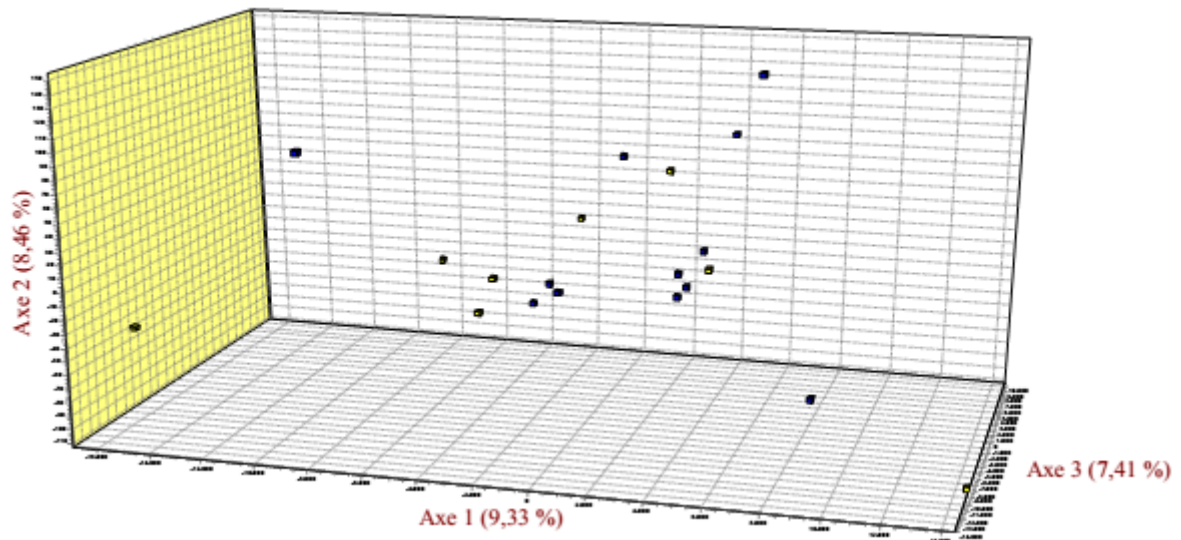


FIGURA 14 - Gráfico da atribuição dos indivíduos de *S. hilarii* obtido pelo Structure com $k = 2$, sem informação a priori, representando uma população não diferenciada no ribeirão Cubatão. Os números laterais indicam a probabilidade de o indivíduo pertencer à determinada população.



Na análise fatorial de correspondência (FIGURA 15), é possível observar a sobreposição dos indivíduos das duas populações amostrais.

FIGURA 15 - Representação gráfica da análise fatorial de correspondência considerando duas populações prévias de *S. hilarii*.



População Abril/2012 (amarelo); População Setembro/2012 (azul)

As coletas das duas amostragens do ribeirão do Cubatão foram feitas no intervalo entre dois períodos reprodutivos, quando os peixes não estão migrando, portanto não formam cardumes (GODOY, 1875). E ainda, foram coletados no mesmo ano. Esses fatores justificam o resultado encontrado. Diante da ausência de estruturação entre as amostragens, seguimos as análises de diversidade genética considerando todos os indivíduos amostrados como pertencentes a uma única população.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) calculados para os 15 locos variaram de 0,434 (Sfra 10) a 0,916 (Sfra 15). Todos os locos apresentaram conteúdo de informação polimórfica elevado. Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os pares de locos na população do ribeirão do Cubatão. Apenas o loco Sfra 04 apresentou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, após correção de Bonferroni (TABELA 17). As análises no software MICRO-CHECKER indicaram presença de alelos nulos nesse loco.

Para caracterizar a diversidade genética, foi estimado o número de alelos (N_a), número efetivo de alelos (N_e), a riqueza alélica (R_a) e a heterozigosidade esperada (H_e). O N_a variou de três (Sfra 04) a 18 (Sfra 02), com média de 9,8 alelos por loco, enquanto que o N_e variou de 2,15 (Sfra 04) a 12,69 (Sfra 02), com média de 6,018. Os valores de R_a , baseados em 20 indivíduos diplóides, variaram de três (Sfra 04) a 18 (Sfra 02), com média de 9,8, e os valores de H_e de 0,535 (Sfra 04) a 0,921 (Sfra 02). A diversidade genética encontrada esteve entre 0,563 (Sfra 04) e 0,491 (Sfra 02) (TABELA 17).

TABELA 17 - Dados de diversidade genética por loco de *S. hilarii* amostrados no ribeirão do Cubatão.

Loco	N	N_a	N_e	H_e	H_o	P_{HW}	Dg	F_{IS}	P_L	OS	R_a	PIC
Sh01	20	11	5,926	0,831	0,550	0,007	0,861	0,361	0,003	1,000	11	0,815
Sh05	20	12	6,557	0,848	0,800	0,159	0,871	0,082	0,283	0,906	12	0,831
Sh12	20	14	7,339	0,864	0,800	0,100	0,888	0,099	0,160	0,966	14	0,854
Sh49	20	9	7,407	0,865	0,900	0,519	0,887	-0,015	0,670	0,593	9	0,851
Sh56	20	11	5,556	0,820	0,800	0,473	0,842	0,050	0,370	0,826	11	0,8
Sh85	20	10	6,349	0,843	0,850	0,467	0,864	0,017	0,543	0,710	10	0,825
Sfra 02	20	18	12,698	0,921	0,800	0,059	0,949	0,157	0,020	0,996	18	0,916
Sfra 03	20	8	7,018	0,858	0,900	0,204	0,879	-0,024	0,693	0,586	8	0,841
Sfra 04	20	3	2,151	0,535	0,000	0,000*	0,563	1,000	0,003	1,000	3	0,436
Sfra 05	20	5	3,265	0,694	0,700	0,618	0,712	0,017	0,553	0,656	5	0,647
Sfra 10	20	5	2,388	0,581	0,500	0,014	0,599	0,165	0,220	0,893	5	0,537
Sfra 13	20	12	6,504	0,846	0,650	0,049	0,874	0,256	0,013	1,000	12	0,83
Sfra 14	20	11	6,557	0,848	0,800	0,175	0,871	0,082	0,313	0,873	11	0,831
Sfra 15	20	12	7,843	0,873	0,900	0,688	0,895	-0,006	0,653	0,663	12	0,86
Sfra 18	20	6	2,712	0,631	0,550	0,010	0,650	0,154	0,176	0,943	6	0,589
Média	20	9,8	6,018	0,790	0,700	-	0,813	0,159	-	-	9,8	0,764

N , número amostral; N_a , número de alelos; H_e , heterozigosidade esperada; H_o , heterozigosidade observada; P_{HW} , desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0.003$ (ajustado com a correção de Bonferroni); Dg, diversidade genética; F_{IS} , coeficiente de endocruzamento; P_L , valores de P para o déficit de heterozigotos; P_S ,

valores de P para o excesso de heterozigotos; Ra , riqueza alélica, Ne , número efetivo de alelos, PIC: conteúdo de informação polimórfica. * Valores significantes.

Usamos os dados de diversidade genética da população do rio do Carmo para comparação. Apesar do baixo número de indivíduos amostrados no rio do Carmo (09 indivíduos), obtivemos a média de 7,73 alelos por loco. Já no Cubatão (20 indivíduos) obtivemos 9,8 alelos por loco. Outros estudos realizados com *S. hilarii* evidenciaram 6,18 alelos por loco na bacia do alto São Francisco, utilizando nove locos polimórficos em 44 indivíduos (NUNES, 2010), e 13,7 alelos por loco foi encontrado por Silva (2009) em outros rios da bacia do alto Paraná em 151 indivíduos analisados com cinco locos. Outros dados de diversidade genética, como média da heterozigosidade esperada (He) e média da riqueza alélica (Ra), apresentaram valores próximos para os rios do Carmo ($He = 0,745$ e $Ra = 7,384$) e do Cubatão ($He = 0,790$ e $Ra = 9,8$). Para esses mesmos dados, os valores encontrados na bacia do alto São Francisco foram inferiores, sendo 0,681 para He e 4,29 para Ra .

De acordo com o resultado do programa BOTTLENECK, sugerimos que a população do ribeirão do Cubatão passou por uma redução recente em seu tamanho populacional, já que o valor de P para o Modelo Alelo Infinito (IAM) foi significativo para excesso de heterozigotos (TABELA 18). Populações que sofreram uma recente redução no seu tamanho populacional apresentam uma consequente redução nos números de alelos e heterozigosidades. Mas a diversidade alélica é reduzida mais rapidamente do que a heterozigosidade. Dessa forma, a heterozigosidade do equilíbrio de Wright-Fisher (equilíbrio mutação-deriva) decresce mais rapidamente do que a heterozigosidade esperada de Hardy-Weinberg, sendo a primeira menor do que a última. Isso tem sido demonstrado apenas para locos sob evolução no IAM. Se o loco evolui sob o Modelo de Mutação Passo-a-passo (SMM) pode haver situações em que esse excesso de heterozigotos não é observada (CORNUET; LUIKART, 1996). No entanto, alguns locos seguem o SMM, e assim que se afastam deste modelo para o modelo de mutação de IAM, eles apresentam um excesso de heterozigosidade, como consequência de um efeito de gargalo (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999).

TABELA 18 - Valores de P para o teste de excesso de heterozigotos de *S. hilarii* no ribeirão do Cubatão, dados obtidos pelo teste de Wilcoxon no programa Bottleneck.

	Modelos		
	IAM	TPM	SMM
Rio do Cubatão	0,00005*	0,2807	0,9793

IAM: Infinite Allele Model; *TPM*: Two Phase Model; *SMM*: Stepwise Mutation Model. * $P < 0,05$.

Para as análises utilizando o marcador molecular D-loop, 18 indivíduos foram analisados (TABELA 19). O cálculo de índice de fixação (*Fst*) par-a-par não apresentou diferenciação entre as amostragens ($P \geq 0,05$) (TABELA 20). A porcentagem de diferenciação, dada pela AMOVA, entre as populações amostrais foi de 2,36 % e dentro das populações amostrais foi de 97,64 %, com *Fst* global de 0,0235 e *P* não significativo ($P \geq 0,05$) (TABELA 21).

TABELA 19 - Número de indivíduos de *Salminus hilarii* utilizados nas análises da Região Controle (D-loop).

Período	Número de amostras
Abril/2012_NR	08
Setembro/2012_NR	10
Total	18

TABELA 20 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de F_{ST} de *P* de F_{ST} .

Abril/2012 – Set/2012	
P de F_{ST}	0,252
F_{ST} par-a-par	0,0235

Nível de significância = 0,0500.

TABELA 21 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.

Fonte da Variação	Porcentagem de Variação	Valor de P - F_{st}
Entre populações	2,36	--
Dentro de populações	97,64	--
F_{ST} -global	0,0234	0,259

Nível de significância = 0,0500.*Valores significativos.

Diante da ausência de estruturação, seguimos as análises considerando todos os indivíduos pertencendo a uma única população.

Foram analisados 560 pb e identificados sete haplótipos com diversidade haplotípica de 0,771 e diversidade nucleotídica de 0,0032. Os testes de neutralidade resultaram em valores negativos ($P < 0,10$), sugerindo que essa população provavelmente passou por um evento de expansão populacional (TABELA 22).

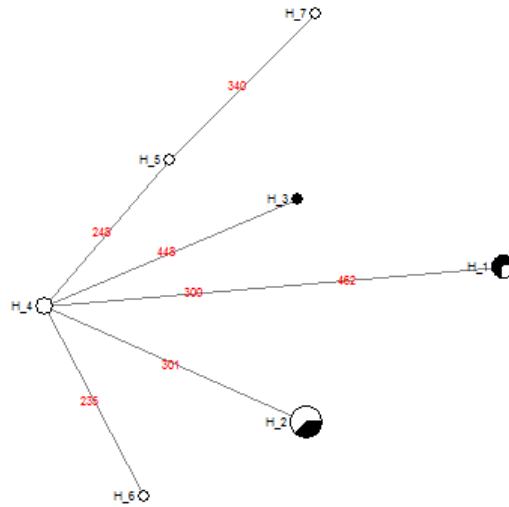
TABELA 22 - Diversidade haplotípica e Teste de Neutralidade de *S. hilarii*.

Rio do	Diversidade genética					Teste de neutralidade			
	N	H	K	Hd	Pi	Tajima's D	D*	F*	Fs de Fu
Cubatão	18	07	1,797	0,771	0,0032	-0,3964	-0,512	-0,553	-1,765

N: tamanho da amostra, H: número de haplótipos, K: média do número de diferenças, Hd: diversidade haplotípica, Pi: diversidade nucleotídica. Nível de significância $\alpha = 0,0500$.

A rede haplotípica evidenciou a ocorrência de haplótipos exclusivos de cada amostragem e também compartilhados (FIGURA 16). As árvores de distância (Neighbor-Joining, Modelo Kimura 2-parâmetros) e de Máxima Verossimilhança, construídas no programa MEGA, também não evidenciaram estruturação, apresentando baixos valores de suporte (FIGURA 17 e FIGURA 18).

FIGURA 16 - Rede haplotípica de *S. hilarii* a partir de seqüências de D-loop.



Haplótipos das populações Abril/2012 (preto), Setembro/2012 (branco). O tamanho dos círculos é proporcional ao número de háplótipos compartilhados e os números em vermelho representam substituições nucleotídicas.

FIGURA 17 - Árvore de distância de *S. hilarii* construída a partir de seqüências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Neighbor-Joining.

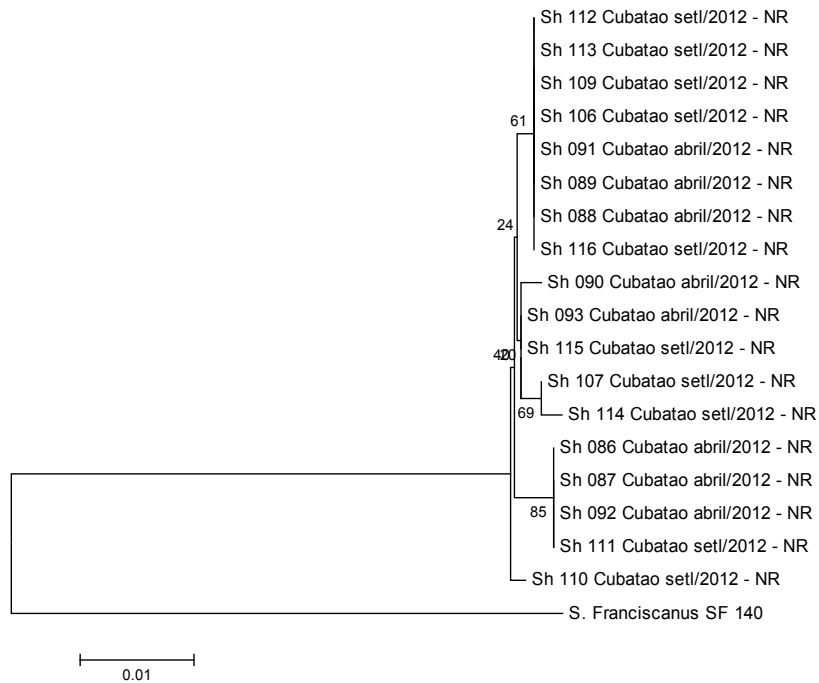
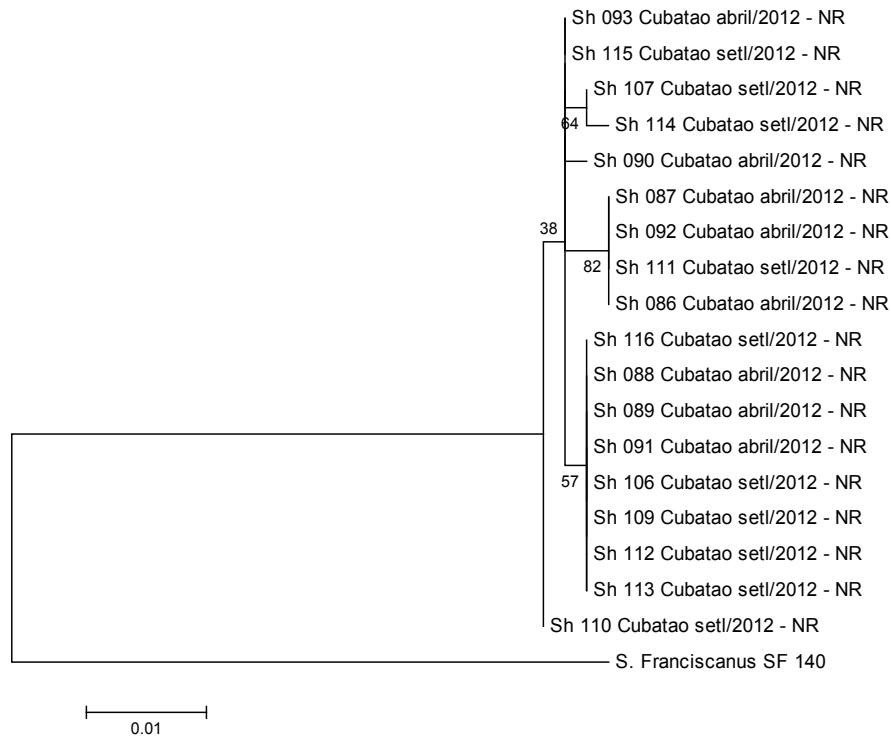


FIGURA 18 - Árvore filogenética de *S. hilarii* construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Máxima Verossimilhança.



Os resultados gerados pelas análises do D-loop demonstraram ausência de diferenciação genética no rio do Cubatão, concordando com os resultados obtidos por meio das análises de microssatélites.

5.3 Rio Jacaré-pepira

Para as análises de diferenciação genética no rio Jacaré-pepira foram utilizados 14 locos de microssatélites. O loco Sh 85 foi retirado das análises, pois não tivemos sucesso na amplificação de vários indivíduos da amostragem de Outubro de 2013. Os valores do índice F_{ST} somente não indicou diferenciação entre as amostragens de Abril de 2012 e Novembro de 2012 e Novembro de 2012 e Outubro de 2013. Ao contrário do índice F_{ST} , os valores de R_{ST} não indicaram diferenciação entres as amostragens (TABELA 23). O índice de diferenciação de Jost (D_{est}) apresentou valores baixos entre as amostragens de Janeiro de 2013 e de Novembro de 2012, indicando não diferenciação entre essas populações (TABELA 24).

TABELA 23 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de R_{ST} abaixo da diagonal e de F_{ST} acima.

	Abril/2012 – NR	Nov/2012 – R	Jan/2013 – R	Out/2013 – R	Out/2014 – R
Abril/2012 – NR	-	0,0285	0,0838*	0,1045*	0,1196*
Nov/2012 – R	-0,025	-	0,0515	0,0641	0,0739*
Jan/2013 – R	0,0469	0,0226	-	0,0805*	0,1523*
Out/2013 – R	-0,0063	-0,0477	-0,0255	-	0,1311*
Out/2014 – R	-0,0462	-0,0656	-0,0186	-0,0603	-

* Valores significativos de F_{ST} . Valores de $\alpha \leq 0,01$ após a correção de Bonferroni

TABELA 24 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de D_{est} abaixo da diagonal.

	Abril/2012 – NR	Nov/2012 – R	Jan/2013 – R	Out/2013 – R	Out/2014 – R
Abril/2012 – NR	-				
Nov/2012 – R	0,0444	-			
Jan/2013 – R	0,0897	0,0020	-		
Out/2013 – R	0,0656	0,1040	0,0413	-	
Out/2014 – R	0,3740	0,0776	0,1150	0,0512	-

A Análise de Variância Molecular apresentou variação de 9,7 entre as populações amostrais e de 91,3 % dentro das populações amostrais. O valor de F_{ST} -global foi significativo (TABELA 25).

TABELA 25 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.

Fonte da Variação	Porcentagem de Variação	Valor de P - F_{ST}
Entre populações	9,7	--
Dentro de populações	91,3	--
F_{ST} -global	0,086	0.000*

Nível de significância = 0,05. *Valores significantes

Os resultados indicaram diferenciação populacional entre os períodos amostrados. Apesar dos valores de F_{ST} não terem concordado com os valores de R_{ST} , que não apontou diferenciação entre as amostragens, os dados da AMOVA apresentados foram significativos, com porcentagem de variação entre as amostragens relativamente alta.

O valor de K dado pelo do método de Pritchard et al. (2000) foi igual a um e pelo método de Evanno et al. (2005), o K foi igual a quatro (FIGURA 19). A análise de atribuição bayesiana realizada no programa STRUCTURE, sem informação *a priori*, evidenciou uma possível estruturação populacional no rio Jacaré-pepira (FIGURA 20).

FIGURA 19 - Estimativa do número real de populações de acordo com o método Evanno et al (2005), evidenciando $k = 4$ (à esquerda) e de Pritchard (2000) evidenciando $k = 1$ (à direita).

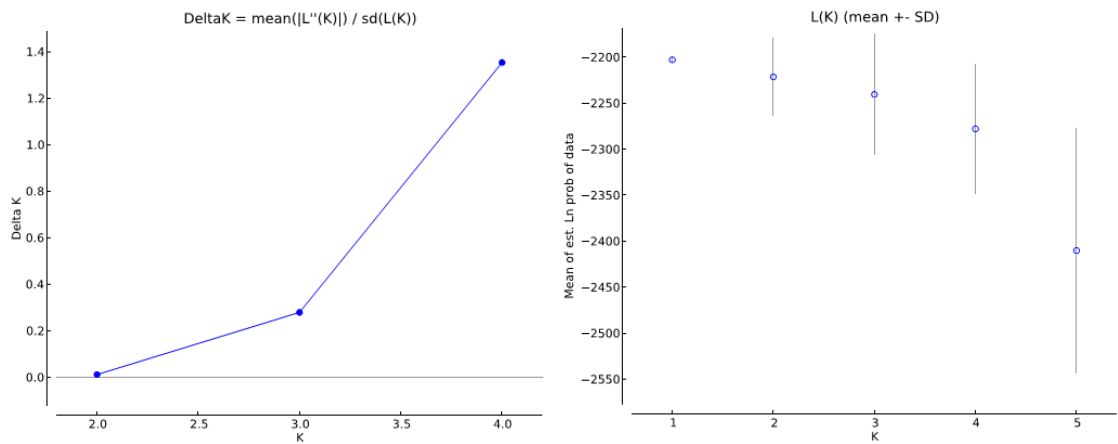
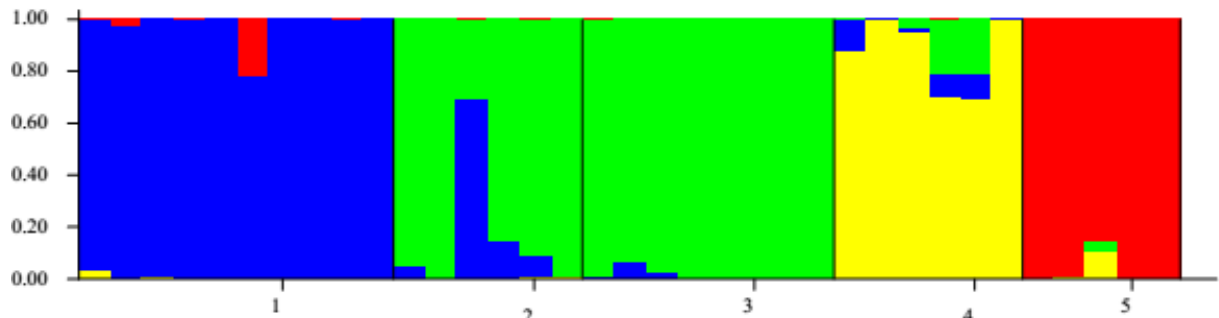


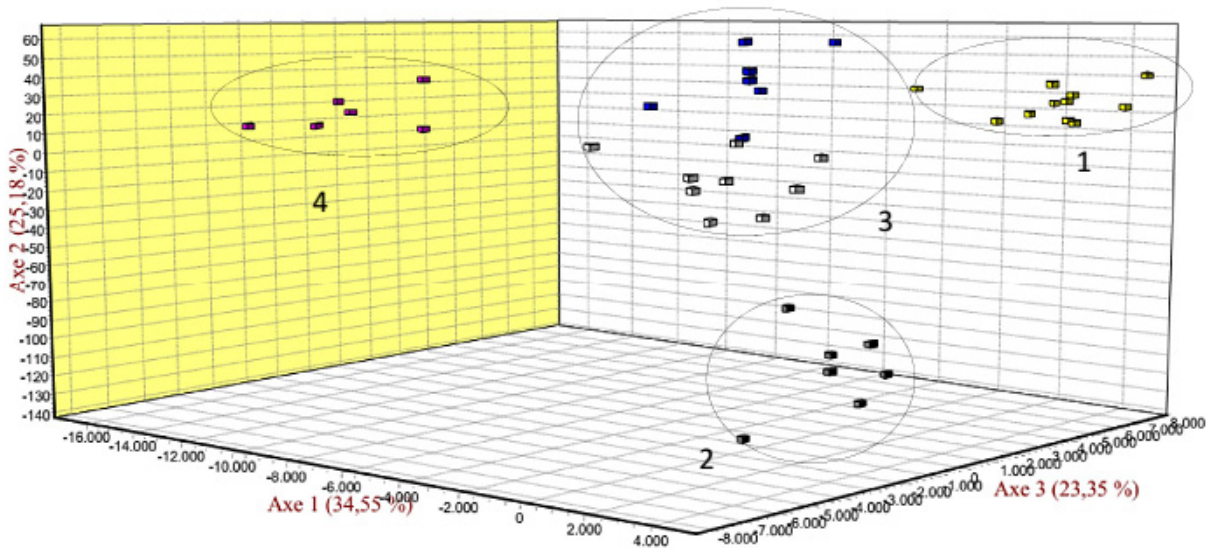
FIGURA 20 - Gráfico da atribuição dos indivíduos de *S. hilarii* obtido pelo Structure com $k = 4$, sem informação *a priori*, no rio Jacaré-pepira. Os números laterais indicam a probabilidade de o indivíduo pertencer à determinada população.



População: 1. Abril/2012; 2. Nov/2012; 3. Jan/2013; 4. Out/2013; 5. Out/2014.

Na análise fatorial de correspondência é possível observar no gráfico a separação das populações formando quatro grupos distintos, sendo as amostragens de Novembro de 2012 e Janeiro de 2013 arranjadas mais próximas (FIGURA 21).

FIGURA 21 - Representação gráfica da análise fatorial de correspondência considerando duas populações prévias de *S. hylarii*.



Grupo 1: Abril/2012 (amarelo), grupo 2: Outubro/2013 (cinza), grupo 3: Novembro/2012 (azul) e Janeiro/2013 (branco), grupo 4: Outubro/2014 (rosa).

Análise de atribuição bayesiana concorda com a análise fatorial de correspondência e também com o índice de diferenciação de Jost (D_{est}). Essas análises agruparam as amostragens de Novembro de 2012 e Janeiro de 2013 em um mesmo clado

Dessa forma, identificamos diferenciação genética temporal entre populações dos diferentes períodos amostrados. Sendo os indivíduos amostrados em Novembro de 2012 e Janeiro de 2013 representantes de uma mesma população. Essas amostragens fazem parte de um mesmo período reprodutivo, descartando a ocorrência de ondas de desova nesse rio. Entende-se por ondas de desova, ou *spawning waves*, grupos ou cardumes de peixes geneticamente diferenciados, que desovam em um mesmo local, porém em diferentes momentos ou em momentos ligeiramente sobrepostos, dentro de um mesmo período reprodutivo (HAY, 1985; JØRGENSEN et al., 2005, RIBOLLI, 2014). Porém, ondas de desova é um conceito aplicado apenas para algumas espécies de migradores que se reproduzem em locais específicos (JØRGENSEN et al., 2005; SO; MAES;VOLCKAERT, 2006; PUMITINSEE et al., 2009).

Considerando os resultados do cálculo de Evanno e análise fatorial de correspondência sendo todos sugestivos da não diferenciação entre as amostragens de Novembro de 2012 e Janeiro de 2013, seguimos com as análises de diversidade genética

considerando essas duas populações como uma única população, denominada Novembro de 2012/ Janeiro de 2013. As demais populações foram analisadas separadamente.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) calculados para os 14 locos foram baixos para os locos Sh 56 (Abril de 2012), Sfra 10 (Novembro de 2012/ Janeiro de 2013), Sfra 04 e Sfra 18 (Outubro de 2013), Sh 49 e Sfra 18 (Outubro de 2014). Os demais locos apresentaram conteúdo de informação polimórfica elevado. Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os pares de locos nas amostragens do rio Jacaré-pepira. Das quatro populações evidenciadas pelas análises de diferenciação genética, apenas Outubro de 2014 não apresentou desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Na população amostral de Abril de 2012 apenas o loco Sfra 04 se desviou do EHW, apresentando também déficit de heterozigotos e além da presença de alelos nulos para esse loco. Já para Novembro de 2012/Janeiro de 2013 quatro locos apresentaram desvios do EHW (Sh 05, Sfra 02, Sfra 04 e Sfra 15). Na amostragem de Outubro de 2013, o loco Sfra 14 apresentou desvios do EHW e o loco Sfra 03 não foi possível realizar esse cálculo (Tabela 26, TABELA 27, TABELA 28 e TABELA 29). Como sabemos, as forças evolutivas que causam desvios do EHW atuam de forma diferente em cada população, acredita-se que a causa mais provável dos desvios para esses locos seja a presença de alelos nulos, já que as análises no software MICRO-CHECKER indicaram que esses locos apresentaram elevadas frequências de alelos nulos nas amostragens correspondentes.

Para caracterizar a diversidade genética, foi estimado o número de alelos (N_a), número efetivo de alelos (N_e), a riqueza alélica (R_a) e a heterozigosidade esperada (H_e). A média N_a variou de 4,50 (Outubro de 2014) a 8,64 (Novembro de 2012/ Janeiro de 2013), enquanto que a média do N_e variou de 3,59 (Outubro de 2014) a 5,48 (Novembro de 2012/Janeiro de 2013). As médias dos valores de R_a , baseados em apenas dois indivíduos diplóides, variaram de 2,819 (Outubro de 2013) a 8,64 (Novembro de 2012/ Janeiro de 2013), e as médias dos valores de H_e de 0,610 (Outubro de 2014) a 0,757 (Novembro de 2012/ Janeiro de 2013). A média da diversidade genética encontrada esteve entre 0,725 (Outubro de 2013) e 0,793 (Outubro de 2014) (TABELA 26, TABELA 27, TABELA 28 e TABELA 29).

TABELA 26 - Dados de diversidade genética por loco de *S. hilarii* amostrados no rio Jacaré-pepira, amostragem Abril de 2012.

Loco	N	Na	Ne	He	Ho	P _{HW}	Dg	F _{IS}	P _L	P _S	Ra	PIC
Sh01	10	8	5,00	0,800	0,800	0,342	0,844	0,053	0,506	0,833	3,179	0,777
Sh05	10	12	10,0	0,900	0,700	0,005	0,961	0,272	0,018	1,000	3,691	0,891
Sh12	10	8	4,00	0,750	0,700	0,143	0,794	0,119	0,328	0,904	3,006	0,729
Sh49	10	7	5,26	0,810	1,000	1,000	0,844	-0,184	1,000	0,170	3,204	0,785
Sh56	10	4	1,37	0,270	0,200	0,156	0,289	0,308	0,152	1,000	1,600	0,259
Sfra 02	10	9	6,06	0,835	0,700	0,098	0,889	0,213	0,107	0,981	3,335	0,815
Sfra 03	9	9	5,58	0,821	1,000	1,000	0,861	-0,161	1,000	0,206	3,314	0,802
Sfra 04	10	4	2,10	0,525	0,100	0,00*	0,578	0,827	0,00*	1,000	2,186	0,480
Sfra 05	10	6	4,44	0,775	0,900	0,876	0,811	-0,110	0,890	0,427	3,032	0,741
Sfra 10	10	3	2,53	0,605	0,800	0,849	0,628	-0,274	0,935	0,217	2,318	0,527
Sfra 13	10	10	8,00	0,875	0,900	0,251	0,922	0,024	0,568	0,805	3,547	0,862
Sfra 14	10	6	3,70	0,730	0,700	0,463	0,772	0,094	0,390	0,870	2,886	0,699
Sfra 15	10	11	8,69	0,885	0,800	0,095	0,939	0,148	0,137	0,980	3,607	0,874
Sfra 18	10	4	2,56	0,610	0,700	0,799	0,639	-0,096	0,795	0,477	2,401	0,554
Média	9,9	7,2	4,95	0,728	0,714	-	0,769	0,088	-	-	2,950	0,699

N, número amostral; *Na*, número de alelos; *H_e*, heterozigosidade esperada; *H_o*, heterozigosidade observada; *P_{HW}*, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0,003$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); *Dg*, diversidade genética; *F_{IS}*, coeficiente de endocruzamento; *P_L*, valores de *P* para o déficit de heterozigotos; *P_S*, valores de *P* para o excesso de heterozigotos; *Ra*, riqueza alélica, *Ne*, número efetivo de alelos. * valores significantes.

TABELA 27 - Dados de diversidade genética por loco de *S. hilarii* amostrados no rio Jacaré-pepira, amostragem Novembro de 2012/Janeiro de 2013.

Loco	N	Na	Ne	He	Ho	P _{HW}	Dg	F _{IS}	P _L	P _S	Ra	PIC
Sh01	14	11	6,877	0,855	0,857	0,340	0,887	0,034	0,5107	0,8036	3,383	0,840
Sh05	14	14	8,340	0,880	0,714	0,000*	0,920	0,224	0,0071	0,9964	3,517	0,869
Sh12	14	15	11,879	0,916	0,714	0,003	0,959	0,255	0,0071	1,000	3,707	0,910
Sh49	14	6	4,962	0,798	0,500	0,014	0,841	0,405	0,0071	1,000	3,081	0,769
Sh56	14	9	4,667	0,786	0,857	0,664	0,813	-0,054	0,8321	0,4571	3,066	0,760
Sfra 02	14	13	10,316	0,903	0,500	0,000*	0,953	0,476	0,0036	1,000	3,632	0,895
Sfra 03	14	6	3,161	0,684	0,714	0,427	0,709	-0,008	0,6571	0,6179	2,668	0,648
Sfra 04	14	4	2,465	0,594	0,286	0,002*	0,629	0,546	0,0107	1,000	2,329	0,540
Sfra 05	14	5	3,350	0,702	0,500	0,128	0,736	0,321	0,0536	0,9929	2,681	0,653
Sfra 10	14	3	2,000	0,500	0,643	0,920	0,514	-0,251	0,9107	0,2250	2,023	0,427
Sfra 13	14	11	6,031	0,834	0,714	0,076	0,871	0,180	0,0964	0,9857	3,284	0,816
Sfra 14	14	8	4,170	0,760	0,857	0,401	0,786	-0,091	0,8750	0,3536	2,982	0,737
Sfra 15	14	12	6,426	0,844	0,571	0,000*	0,887	0,356	0,0036	1,000	3,355	0,831
Sfra 18	14	4	2,190	0,543	0,429	0,016	0,569	0,246	0,2143	0,9393	2,160	0,477
Média	14	8,64	5,488	0,757	0,633	-	0,791	0,188	-	-	2,991	0,726

N, número amostral; *Na*, número de alelos; *H_e*, heterozigosidade esperada; *H_o*, heterozigosidade observada; *P_{HW}*, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0,003$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); *Dg*, diversidade genética; *F_{IS}*, coeficiente de endocruzamento; *P_L*, valores de *P* para o déficit de heterozigotos; *P_S*, valores de *P* para o excesso de heterozigotos; *Ra*, riqueza alélica, *Ne*, número efetivo de alelos. * valores significantes.

TABELA 28 - Dados de diversidade genética por loco de *S. hilarii* amostrados no rio Jacaré-pepira, amostragem Outubro de 2013.

Loco	N	Na	Ne	He	Ho	P _{HW}	Dg	F _{IS}	P _L	P _S	Ra	PIC
Sh01	6	5	3,00	0,667	0,333	1,000	0,767	0,565	0,0157	1,000	2,715	0,622
Sh05	6	10	9,00	0,889	1,000	1,000	0,967	-0,034	1,000	0,8086	3,818	0,878
Sh12	6	8	6,00	0,833	1,000	0,012	0,900	-0,111	1,000	0,5471	3,491	0,814
Sh49	6	3	2,66	0,625	0,167	1,000	0,733	0,773	0,0143	1,000	2,461	0,555
Sh56	6	6	4,80	0,792	1,000	0,574	0,850	-0,176	1,000	0,3707	3,253	0,763
Sfra 02	6	6	4,80	0,792	0,833	1,000	0,867	0,038	0,6114	0,7950	3,236	0,760
Sfra 03	6	3	1,41	0,292	0,333	-	0,317	-0,053	1,000	0,9050	1,667	0,272
Sfra 04	6	2	1,18	0,153	0,167	0,286	0,167	0,000	1,000	1,000	1,333	0,141
Sfra 05	6	5	3,60	0,722	0,667	0,430	0,800	0,167	0,3536	0,9071	2,917	0,680
Sfra 10	6	5	3,27	0,694	0,667	1,000	0,767	0,130	0,4721	0,8829	2,788	0,644
Sfra 13	6	8	6,54	0,847	1,000	0,450	0,917	-0,091	1,000	0,5893	3,564	0,830
Sfra 14	6	6	3,27	0,694	0,667	0,003*	0,767	0,130	0,4686	0,9214	2,879	0,665
Sfra 15	6	8	5,53	0,819	0,500	1,000	0,933	0,464	0,0057	1,000	3,434	0,800
Sfra 18	6	3	1,67	0,403	0,500	1,000	0,433	-0,154	1,000	0,7421	1,909	0,363
Média	6	5,5	4,05	0,659	0,631	-	0,725	0,117	-	-	2,819	0,627

N, número amostral; *Na*, número de alelos; *H_e*, heterozigosidade esperada; *H_o*, heterozigosidade observada; *P_{HW}*, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0,003$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); *Dg*, diversidade genética; *F_{IS}*, coeficiente de endocruzamento; *P_L*, valores de *P* para o déficit de heterozigotos; *P_S*, valores de *P* para o excesso de heterozigotos; *Ra*, riqueza alélica, *Ne*, número efetivo de alelos. * valores significantes.

TABELA 29 - Dados de diversidade genética por loco de *S. hilarii* amostrados no rio Jacaré-pepira, amostragem Outubro de 2014.

Loco	N	Na	Ne	He	Ho	P _{HW}	Dg	F _{IS}	P _L	P _S	Ra	PIC
Sh01	5	6	5,00	0,800	0,600	0,097	0,925	0,351	0,1107	0,9893	3,367	0,772
Sh05	5	7	4,54	0,780	0,800	0,612	0,875	0,086	0,6150	0,9493	3,329	0,758
Sh12	4	6	5,33	0,813	0,500	0,037	1,000	0,500	0,0364	1,000	3,571	0,786
Sh49	2	2	2,00	0,500	1,000	1,000	0,500	-1,000	1,000	0,6664	2,000	0,375
Sh56	5	6	4,16	0,760	0,800	0,140	0,850	0,059	0,6336	0,8679	3,195	0,730
Sfra 02	5	6	5,00	0,800	0,800	0,445	0,900	0,111	0,4500	0,9221	3,367	0,772
Sfra 03	5	4	2,38	0,580	0,800	1,000	0,625	-0,280	1,000	0,3814	2,462	0,535
Sfra 04	5	4	3,33	0,700	0,600	0,301	0,800	0,250	0,3100	0,9329	2,829	0,645
Sfra 05	5	3	2,63	0,620	0,400	0,147	0,725	0,448	0,1386	0,9579	2,476	0,548
Sfra 10	4	3	2,66	0,625	0,500	0,254	0,750	0,333	0,3200	0,9629	2,557	0,555
Sfra 13	3	5	4,50	0,778	0,667	0,213	1,000	0,333	0,2057	1,000	3,600	0,744
Sfra 14	3	4	3,00	0,667	0,667	0,595	0,833	0,200	0,5679	1,000	3,000	0,620
Sfra 15	4	5	4,00	0,750	0,750	0,482	0,875	0,143	0,5021	0,9150	3,214	0,712
Sfra 18	5	2	1,72	0,420	0,600	1,000	0,450	-0,333	1,000	0,6514	1,833	0,332
Média	4,2	4,5	3,59	0,610	0,677	-	0,793	0,085	-	-	2,914	0,634

N, número amostral; *Na*, número de alelos; *H_e*, heterozigosidade esperada; *H_o*, heterozigosidade observada; *P_{HW}*, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0,003$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); *Dg*, diversidade genética; *F_{IS}*, coeficiente de endocruzamento; *P_L*, valores de *P* para o déficit de heterozigotos; *P_S*,

valores de P para o excesso de heterozigotos; Ra , riqueza alélica, Ne , número efetivo de alelos. * valores significantes.

A média do número de alelos por loco observada nos grupos amostrais foi menor na amostragem de Outubro de 2014 (4,5). Sendo essa a amostragem com menor número de indivíduos coletados, apenas cinco indivíduos. O valor mais alto da média de alelos por loco foi de 8,64 para Novembro de 2013/Janeiro de 2014. Os valores médios de Ra foram semelhantes entre os quatro grupos amostrais, variando de 2,819 a 2,991. Esses valores foram bem inferiores em comparação com as amostragens dos rios do Carmo e do Cubatão, discutidos anteriormente. Os valores médios de He foram mais baixos para Outubro de 2013 e Outubro de 2014 (0,659 e 0,610, respectivamente). Enquanto para Abril de 2012 foi de 0,728 e para Novembro 2013/Janeiro de 2014 foi de 0,757. Ribolli (2014) encontrou valores mais altos de He em *Salminus brasiliensis* na bacia do baixo médio Uruguai (média de 0,825), Silva (2009) também encontrou valores elevados de He para *Salminus hilarii*, variando de 0,865 a 0,939.

O programa BOTTLENECK indicou que a amostragem Novembro de 2012/Janeiro de 2013 passou por uma redução recente em seu tamanho populacional, pois o valor de P para IAM foi significativo para excesso de heterozigotos (TABELA 30). Assim como foi discutido a evidência desse evento para o ribeirão do Cubatão, populações que sofreram uma recente redução em seu tamanho populacional possuem uma consequente redução nos números de alelos e heterozigosidade de Wright-Fisher.

TABELA 30 - Valores de P para o teste de excesso de heterozigotos de *S. hilarii* no rio do Jacaré-pepira, dados obtidos pelo teste de Wilcoxon no programa Bottleneck.

	Modelos		
	IAM	TPM	SMM
Abril/2012	0,052	0,357	0,852
Nov/2012-Jan/2013	0,020*	0,687	0,979
Outubro/2013	0,852	0,903	0,975
Outubro/2014	0,195	0,312	0,427

IAM Infinite Allele Model; *TPM* Two Phase Model; *SMM* Stepwise Mutation Model. * $P < 0,05$.

Analisamos 31 indivíduos com o marcador mitocondrial D-loop (TABELA 31). O cálculo de índice de fixação (F_{ST}) par-a-par evidenciou diferenciação moderada para estruturação temporal entre as amostragens de Abril de 2012 e Outubro de 2013. (TABELA 32). A porcentagem de diferenciação, dada pela AMOVA, entre as populações amostrais foi de 6,39 % e dentro das populações amostrais foi de 93,61 %, com F_{ST} global de 0,0801 e P não significativo ($P \geq 0,05$) (TABELA 33).

TABELA 31 - Número de indivíduos de *S. hilarii* utilizados nas análises da Região Controle (D-loop).

Período	Número de amostras
Abril/2012 – NR	09
Novembro/2012 – R	05
Janeiro/2013 – R	06
Outubro/2013 – R	06
Outubro/2014 – R	05
Total	31

TABELA 32 - Estimativas F_{ST} par-a-par (diagonal abaixo) e valores de P de F_{ST} (diagonal acima)

	Abril/2012- R	Nov/2012-R	Jan/2013-R	Out/2013-R	Out/2014-R
Abril/2012 – NR	-	0,5675	0,7297	0,0270*	0,2072
Nov/2012 – R	-0,035	-	0,5495	0,2792	0,7927
Jan/2013 – R	-0,060	-0,0284	-	0,0630	0,6126
Out/2013 – R	0,2075	0,0774	0,1937	-	0,0720
Out/2014 – R	0,0717	-0,024	-0,0190	0,1179	-

Nível de significância após correção de Bonferroni = 0,0100. * Valor indicando diferenciação moderada.

TABELA 33 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.

Fonte da Variação	Porcentagem de Variação	Valor de P - F_{ST}
Entre populações	6,39	--
Dentro de populações	93,61	--
F_{ST} -global	0,0638	0,0801

Nível de significância = 0,0500.

Diante da ausência de estruturação populacional, seguimos as análises considerando todos os indivíduos pertencendo a uma única população. Foram analisados 560 pb e identificados nove haplótipos com diversidade haplotípica de 0,886 e diversidade nucleotídica de 0,0047. Os testes de neutralidade resultaram em valores negativos ($P < 0,10$), sugerindo que essa população provavelmente passou por um evento de expansão populacional (TABELA 34).

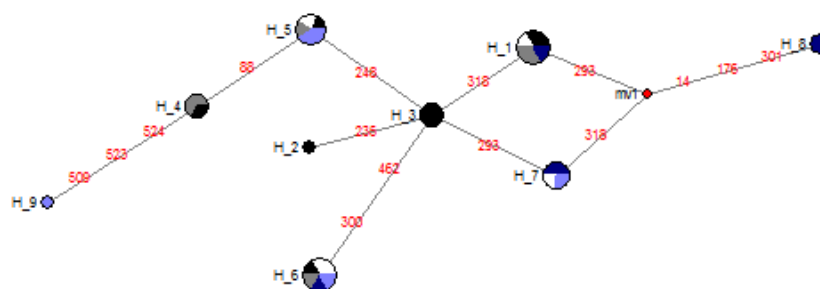
TABELA 34 - Diversidade haplotípica e Teste de Neutralidade de *S.hilarii* referente à análise da Região Controle (D-loop).

Rio Jacaré-pepira	Diversidade genética					Teste de neutralidade			
	N	H	K	Hd	Pi	Tajima's D	D*	F*	Fs de Fu
	31	09	2,654	0,886	0,0047	-0,605	-0,283	-0,451	-1,045

N: tamanho da amostra, H: número de haplótipos, K: média do número de diferenças, Hd: diversidade haplotípica, Pi: diversidade nucleotídica. Nível de significância $\alpha = 0,0500$.

Podemos observar na rede haplotípica o compartilhamento de haplótipos entre as populações amostrais (FIGURA 22). A árvore de distância construída no programa MEGA (Neighbor-Joining, Modelo Kimura 2-parâmetros) (FIGURA 23), apresentou baixos valores de suporte, assim como a árvore de Máxima Verossimilhança (FIGURA 24), evidenciando ausência de estruturação.

FIGURA 22 - Rede haplotípica de *S. hilarii* a partir de sequencias de D-loop.



Haplótipos das populações Abril/2012 (preto), Novembro/2012 (branco), Janeiro/2013 (cinza), Outubro/2013 (azul escuro), Outubro/2014 (azul claro).

FIGURA 23 - Árvore de distância de *S. hilarii* construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Neighbor-Joining.

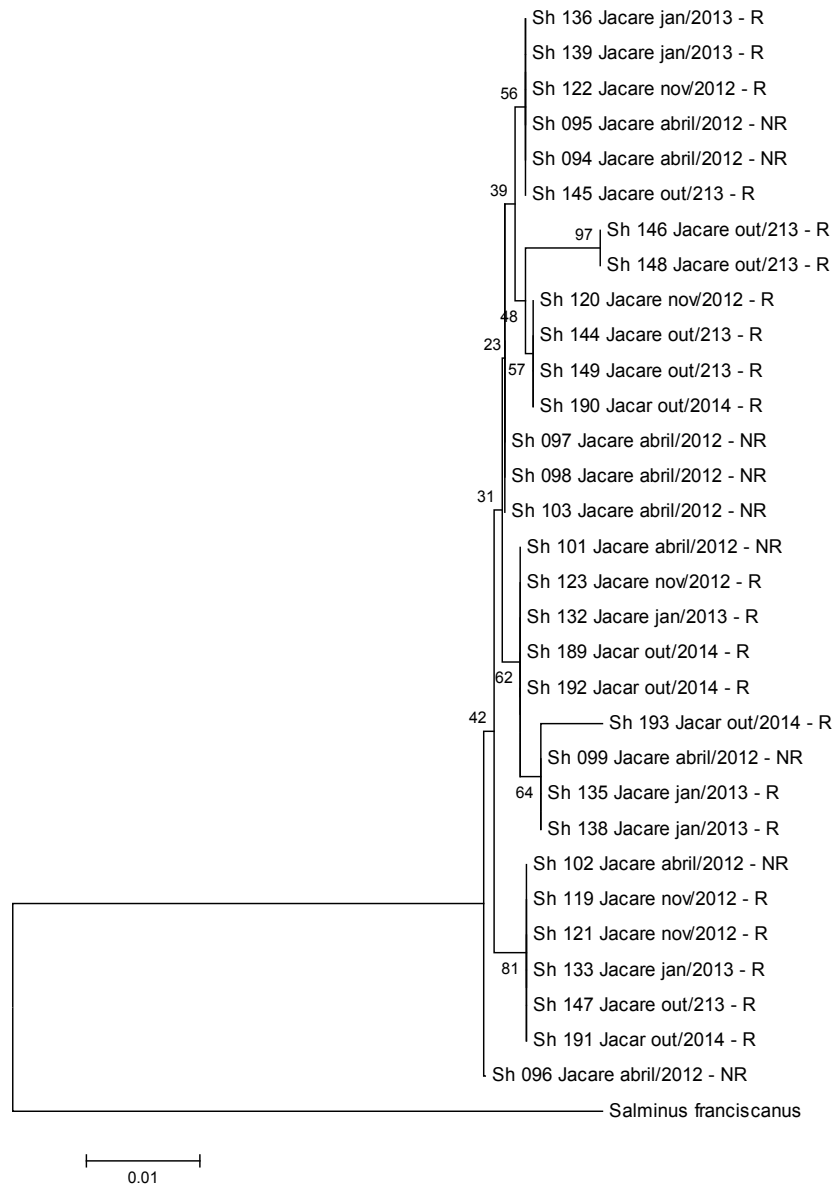
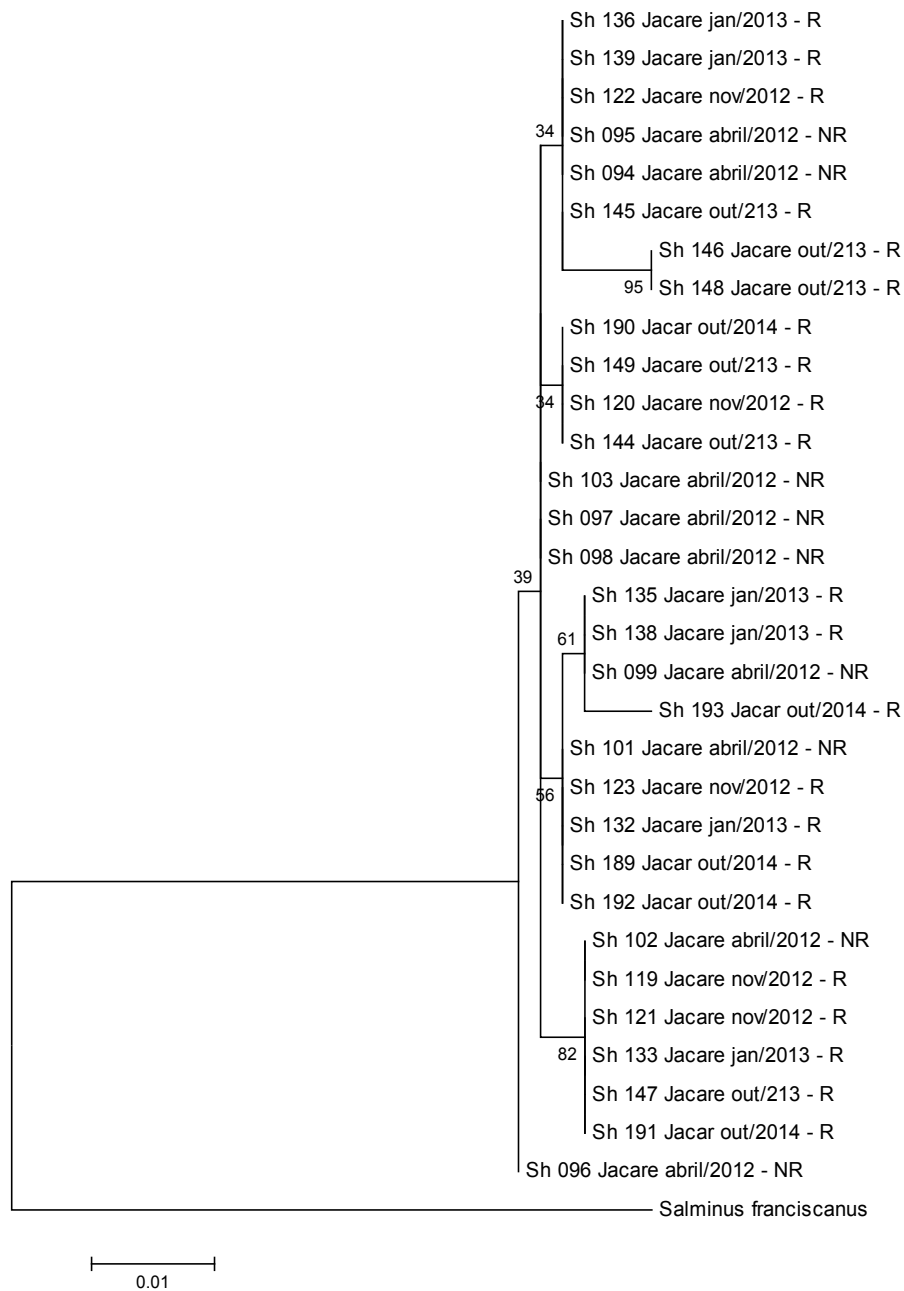


FIGURA 24 - Árvore filogenética de *S. hilarii* construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Máxima Verossimilhança.



Diferente do resultado encontrado com os microssatélites, nos resultados gerados pelas análises do D-loop para as amostragens do rio Jacaré-pepira, encontramos a ausência de diferenciação genética entre elas. Essa incongruência dos dados é esperada pelo fato dos marcadores terem características mutacionais distintas.

5.4 Rio Turvo

Para analisar as populações do rio Turvo, utilizamos 12 locos do marcador microsatélite. Não foi possível identificar os genótipos de vários indivíduos para os locos Sh 49, Sh 85 e Sfra 14, devido a problemas na amplificação dos fragmentos. Por esse motivo esses locos foram excluídos dessas análises. O índice F_{ST} apresentou valores significativos, indicando diferenciação genética entre a amostragem de Outubro de 2013 e as amostragens Outubro de 2011, Fevereiro de 2012 e Novembro de 2012; entre Novembro de 2014 e as amostragens de Outubro de 2011 e Fevereiro de 2012 e ainda entre a amostragem de Fevereiro de 2015 e Novembro de 2012. Os valores de R_{ST} não foram significativos entre as amostragens (TABELA 35). O índice de diferenciação de Jost (D_{est}) apresentou valores baixos entre as amostragens de Outubro de 2011 e Fevereiro de 2012, indicando a não diferenciação entre essas populações amostrais (TABELA 36). O índice de F_{ST} também não apresentou valor significativo pra esse mesmo par de amostragens.

TABELA 35 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de R_{ST} abaixo da diagonal e de F_{ST} acima.

	Out/2011	Fev/2012	Nov/2012	Out/2013	Nov/2014	Fev/2015
Out/2011	-	0,02606	0,02231	0,08757*	0,08096*	0,05621
Fev/2012	-0,01514	-	0,05928	0,1141*	0,10798*	0,04813
Nov/2012	0,17184	0,28587	-	0,05691*	0,06895	0,06768*
Out/2013	0,23520	0,32112	-0,03622	-	0,01212	0,02217
Nov/2014	0,04826	0,11100	0,01731	0,07042	-	0,01876
Fev/2015	0,03297	0,01677	0,17517	0,23836	0,03888	-

* Valores significativos de F_{ST} . Valores de $\alpha \leq 0,008$ após a correção de Bonferroni

TABELA 36 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de D_{est} abaixo da diagonal.

	Out/2011	Fev/2012	Nov/2012	Out/2013	Nov/2014	Fev/2015
Out/2011	-					
Fev/2012	0,0047	-				
Nov/2012	0,1017	0,2520	-			
Out/2013	0,0737	0,2262	0,1436	-		
Nov/2014	0,1775	0,2029	0,1781	0,0906	-	
Fev/2015	0,1200	0,0939	0,3581	0,1314	0,1199	-

A Análise de Variância Molecular apresentou variação entre as populações amostrais de 7,31 % e 92,69 % dentro das populações amostrais. O valor de F_{ST} global foi significativo (TABELA 37).

TABELA 37 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global

Fonte da Variação	Porcentagem de Variação	Valor de P - F_{ST}
Entre populações	7,31	--
Dentro de populações	92,69	--
F_{ST} -global	0,073	0.00*

Nível de significância $\alpha = 0,05$. *Valores significantes

O valor de K dado pelo do método de Pritchard et al. (2000), e também pelo método de Evanno et al. (2005) foi igual a três (FIGURA 25). A análise de atribuição bayesiana realizada no programa STRUCTURE, sem informação *a priori*, identificou uma estruturação populacional no rio Turvo (FIGURA 26).

FIGURA 25 - Estimativa do número real de populações de acordo com o método Evanno et al (2005), evidenciando $k = 3$ (à esquerda) e de Pritchard (2000) evidenciando $k = 3$ (à direita).

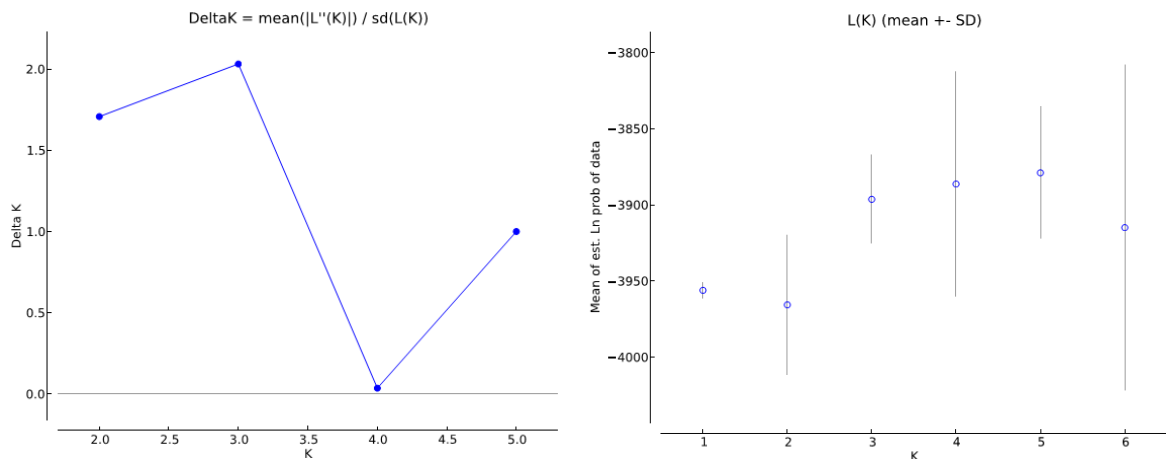
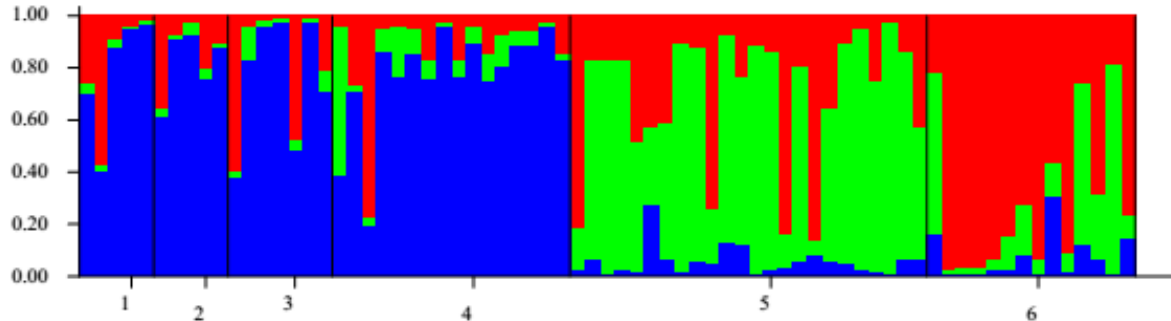


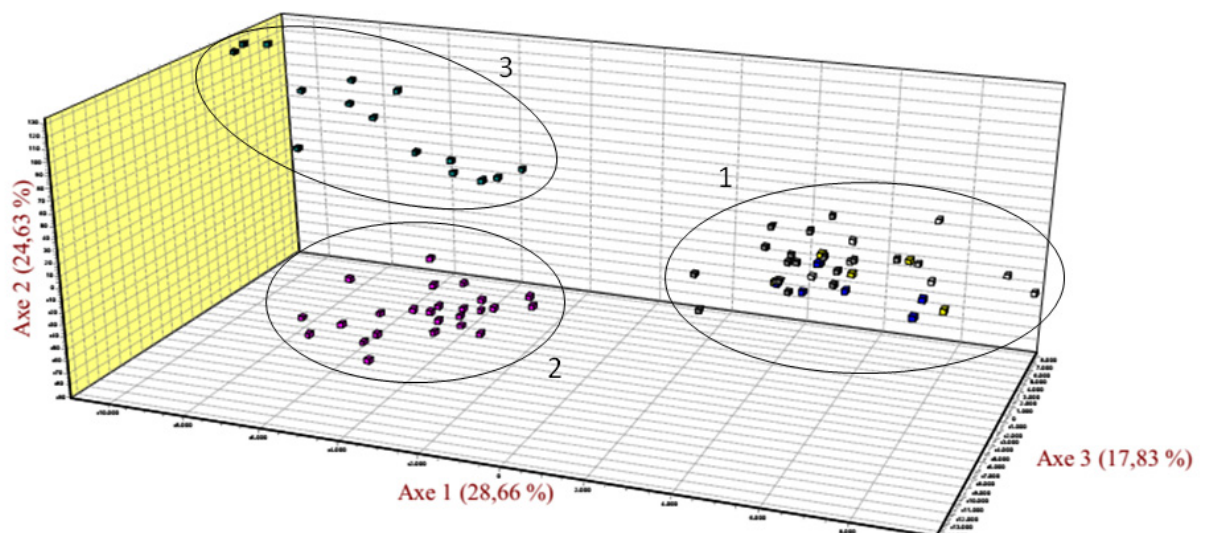
FIGURA 26 - Gráfico da atribuição dos indivíduos de *S. hilarii* obtido pelo Structure com $k = 3$, sem informação *a priori*, representando uma população estruturada no rio Turvo. Cada linha na vertical representa um indivíduo, que possui probabilidades diferentes de ser atribuído a cada um dos *clusters*, indicados pelas distintas cores.



Amostragem 1: Out/2011, 2: Fev/2012, 3: Nov/2012, 4: Out/2013, 5: Nov/2014, 6: Fev/2015.

Na análise fatorial de correspondência é possível observar no gráfico as amostragens agrupadas em três grupos distintos, sendo o grupo um formado por Outubro de 2011, Fevereiro de 2012, Novembro de 2012 e Outubro de 2013, os grupos dois e três formados somente pelas amostragens de Novembro de 2014 e Fevereiro de 2015, respectivamente (FIGURA 27), assim como foi apresentado no gráfico da análise de atribuição bayesiana.

FIGURA 27 - Representação gráfica da análise fatorial de correspondência de *S. hilarii*.



Grupo 1: Out/2011, Fev/2012, Nov/2012 e Out/2013; 2: Nov/2014; 3: Fev/2015.

Os resultados de diferenciação populacional evidenciaram três populações distintas no rio Turvo pelas análises de atribuição bayesiana, análise fatorial de correspondência e ainda pelo método de Pritchard. Os valores do índice F_{ST} , apesar de terem sido significativos entre algumas amostragens, não concordou exatamente com os testes já mencionados, assim como o R_{ST} e o índice de diferenciação de Jost (D_{est}). Sendo assim, consideramos existir três populações geneticamente diferenciadas no rio Turvo. A diferença encontrada pode ser em decorrência de uma tragédia que ocorreu no final de outubro de 2013, logo após a coleta da amostragem de Outubro de 2013.

Em 25 de outubro de 2013, logo após a coleta da amostragem de Outubro de 2013 ter sido realizada, um incêndio destruiu o galpão de armazenamento de açúcar no porto seco da cidade de Santa Adélia, SP. Toneladas do produto queimado vazaram e atingiram casas e o rio São Domingos, um afluente do rio Turvo (G1, 2013). O derramamento matou cerca de quatro toneladas de peixes, e outras 16 foram resgatadas pela Polícia Militar Ambiental do estado de São Paulo e levadas para uma área limpa do próprio rio Turvo (G1, 2013). Mais de 100 quilômetros distantes do local do acidente foi afetado, diminuindo os níveis de oxigênio das águas dos rios atingidos. Segundo o relatório da CETESB, o nível de oxigênio chegou à zero em vários pontos do rio Turvo.

O capitão da Polícia Ambiental, Olivaldi Azevedo, afirmou em uma entrevista ao jornal digital DHOJE (2013) que foram encontrados somente oito dourados durante o resgate dos peixes. Isso se deve ao fato de espécies como dourado, tabarana, curimbatá e piapara serem sensíveis à poluição e no momento que o melaço se expandia mais, eles fugiram. Diante dessa explicação, não podemos descartar a possibilidade de peixes de outros rios que também foram atingidos pelo melaço terem migrado para o rio Turvo, para fugir da poluição. E, dessa forma, coletamos peixes que não pertenciam ao rio Turvo originalmente. Sendo essa, portanto, uma possível explicação para a diferenciação populacional encontrada.

Diante da não diferenciação encontrada entre as amostragens de Outubro de 2011, Fevereiro de 2012, Novembro de 2012 e Outubro de 2013, seguimos com as análises de diversidade genética considerando essas quatro amostragens como uma única população amostral, denominada 2011/2013. As demais amostragens foram analisadas separadamente.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) calculados p foram elevados nos 12 locos de todas as amostragens. Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os pares de locos nas amostragens do rio Turvo. Apresentaram desvios do equilíbrio de

Hardy-Weinberg os locos Sh 05, Sfra 02, Sfra 04 e Sfra 15 na amostragem 2011/2013, Sh 05, Sh 49, Sfra 02, Sfra 04 e Sfra 15 na amostragem de Novembro de 2014 e Sh 01, Sh 56, Sfra 04 e Sfra 15 na amostragem de Fevereiro de 2015 (TABELA 38, TABELA 39 e TABELA 40). As análises no software Micro-Checker indicaram que esses locos apresentaram elevadas frequências de alelos nulos nas populações correspondentes. Uma vez que as forças evolutivas que causam desvios do EHW atuam de forma diferente em cada população, acredita-se que a causa mais provável dos desvios para esse loco seja a presença de alelos nulos. Além disso, o coeficiente de endocruzamento (F_{is}) indicou excesso de heterozigotos para esses locos.

Para caracterizar a diversidade genética foi estimado o número de alelos (N_a), número efetivo de alelos (N_e), a riqueza alélica (R_a) e a heterozigosidade esperada (H_e). A média N_a variou de 11 (Novembro de 2014) a 14,27 (2011/2013), enquanto que a média do N_e variou de 7,29 (Novembro de 2014) a 7,87 (2011/2013). As médias dos valores de R_a , baseado em 11 indivíduos diplídes, variaram de 10,028 (Fevereiro de 2015) a 8,859 (Novembro de 2014), e as médias dos valores de H_e de foram de 0,797 (Novembro de 2014) a 0,833 (Fevereiro de 2015). A média da diversidade genética encontrada esteve entre 0,819 (2011/2013) e 0,870 (Fevereiro de 2015) (TABELA 38, TABELA 39 e TABELA 40).

TABELA 38 - Dados de microssatélites de *S. hilarii* da amostragem 2011/2013.

Loco	N	N_a	N_e	H_e	H_o	P_{HW}	Dg	F_{is}	P_L	P_S	R_a	PIC
Sh01	33	18	7,69	0,870	0,667	0,009	0,887	0,248	0,001*	1,000	10,410	0,859
Sh05	33	20	12,59	0,921	0,818	0,000*	0,937	0,126	0,011	0,997	12,690	0,915
Sh12	33	20	12,37	0,919	0,818	0,005	0,935	0,125	0,026	0,997	12,342	0,914
Sh49	33	12	3,67	0,728	0,788	0,948	0,738	-0,067	0,883	0,270	7,366	0,703
Sfra 02	32	20	12,41	0,919	0,625	0,000*	0,939	0,334	0,001*	1,000	12,631	0,914
Sfra 03	30	7	5,04	0,802	0,700	0,123	0,817	0,143	0,080	0,973	6,051	0,773
Sfra 04	32	8	3,30	0,698	0,594	0,001*	0,711	0,165	0,079	0,976	5,574	0,655
Sfra 05	32	7	3,91	0,745	0,719	0,590	0,757	0,051	0,340	0,805	5,604	0,705
Sfra 10	33	5	2,28	0,562	0,606	0,603	0,570	-0,063	0,754	0,408	3,855	0,499
Sfra 13	33	18	10,17	0,902	0,818	0,055	0,917	0,108	0,052	0,983	11,172	0,894
Sfra 15	31	22	13,16	0,924	0,742	0,000*	0,942	0,213	0,001*	1,000	13,248	0,919
Sfra 18	33	5	3,09	0,636	0,677	0,210	0,688	0,076	0,304	0,818	3,892	0,616
Média	32,2	14,27	7,87	0,817	0,718	-	0,819	0,121	-	-	8,736	0,780

N , número amostral; N_a , número de alelos; H_e , heterozigosidade esperada; H_o , heterozigosidade observada; P_{HW} , desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0,004$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); Dg, diversidade genética; F_{is} , coeficiente de endocruzamento; P_L , valores de P para o déficit de heterozigotos; P_S , valores de P para o excesso de heterozigotos; R_a , riqueza alélica, N_e , número efetivo de alelos. * valores significantes.

TABELA 39 - Dados de microssatélites de *S.hilarii* da amostragem Novembro de 2014.

Loco	N	Na	Ne	He	Ho	P _{HW}	Dg	F _{IS}	P _L	P _S	Ra	PIC
Sh01	22	12	6,67	0,850	0,773	0,023	0,872	0,114	0,129	0,954	9,094	0,834
Sh05	24	16	11,87	0,916	0,708	0,000*	0,940	0,247	0,001*	1,000	12,229	0,910
Sh12	18	12	7,62	0,869	0,778	0,096	0,897	0,133	0,120	0,961	9,955	0,856
Sh49	23	13	4,05	0,753	0,609	0,000*	0,774	0,213	0,023	0,994	8,687	0,736
Sfra 02	20	14	8,88	0,888	0,700	0,000*	0,916	0,236	0,002*	1,000	10,740	0,877
Sfra 03	19	13	8,20	0,878	0,632	0,000*	0,909	0,305	0,002*	1,000	10,490	0,867
Sfra 04	19	7	3,50	0,715	0,421	0,001*	0,743	0,433	0,004	0,998	6,055	0,685
Sfra 05	20	7	4,49	0,778	0,600	0,034	0,803	0,252	0,012	0,998	5,898	0,744
Sfra 10	20	6	2,71	0,631	0,650	0,617	0,647	-0,004	0,601	0,606	4,708	0,562
Sfra 13	22	12	9,04	0,889	0,818	0,018	0,912	0,103	0,143	0,958	10,000	0,879
Sfra 15	22	24	18,61	0,946	0,773	0,000*	0,973	0,206	0,001*	1,000	15,962	0,944
Sfra 18	22	3	1,80	0,447	0,545	0,925	0,456	-0,197	0,931	0,244	2,500	0,366
Média	20	11,58	7,29	0,797	0,667	-	0,820	0,170	-	-	8,859	0,771

N, número amostral; *Na*, número de alelos; *H_e*, heterozigosidade esperada; *H_o*, heterozigosidade observada; *P_{HW}*, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0,003$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); *Dg*, diversidade genética; *F_{IS}*, coeficiente de endocruzamento; *P_L*, valores de *P* para o déficit de heterozigotos; *P_S*, valores de *P* para o excesso de heterozigotos; *Ra*, riqueza alélica, *Ne*, número efetivo de alelos. * valores significantes.

TABELA 40 - Dados de microssatélites de *S. hilarii* da amostragem Fevereiro de 2015.

Loco	N	Na	Ne	He	Ho	P _{HW}	Dg	F _{IS}	P _L	P _S	Ra	PIC
Sh01	14	13	8,00	0,875	0,571	0,000*	0,920	0,379	0,001*	1,000	11,40	0,864
Sh05	14	18	12,64	0,921	0,857	0,034	0,959	0,106	0,130	0,975	15,26	0,916
Sh12	14	12	10,59	0,906	0,857	0,178	0,942	0,090	0,209	0,959	11,34	0,898
Sh56	13	9	3,88	0,743	0,462	0,000*	0,785	0,412	0,004	1,000	8,345	0,722
Sfra 02	14	14	8,52	0,883	0,857	0,496	0,918	0,066	0,334	0,898	12,18	0,873
Sfra 03	11	7	5,26	0,810	0,727	0,331	0,855	0,149	0,209	0,945	7,000	0,786
Sfra 04	14	16	14,00	0,929	0,714	0,002*	0,973	0,266	0,001*	1,000	14,38	0,924
Sfra 05	14	6	4,50	0,778	0,571	0,023	0,816	0,300	0,025	0,991	5,783	0,747
Sfra 10	13	7	3,52	0,716	0,923	0,948	0,737	-0,252	0,993	0,095	6,502	0,672
Sfra 13	13	10	7,68	0,870	0,923	0,465	0,904	-0,021	0,741	0,655	9,615	0,857
Sfra 15	14	16	12,25	0,918	0,643	0,000*	0,964	0,333	0,001*	1,000	13,93	0,913
Sfra 18	14	5	2,80	0,643	0,500	0,030	0,673	0,257	0,138	0,948	4,565	0,578
Média	13,5	11	7,80	0,833	0,717	-	0,870	0,173	-	-	10,02	0,812

N, número amostral; *Na*, número de alelos; *H_e*, heterozigosidade esperada; *H_o*, heterozigosidade observada; *P_{HW}*, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0,003$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); *Dg*, diversidade genética; *F_{IS}*, coeficiente de endocruzamento; *P_L*, valores de *P* para o déficit de heterozigotos; *P_S*, valores de *P* para o excesso de heterozigotos; *Ra*, riqueza alélica, *Ne*, número efetivo de alelos. * valores significantes.

Apesar de termos encontrado elevado número médio de alelos nas três populações (14,2 para de 2011/2013, 11,58 para Novembro de 2014 e 11 para Fev de 2012) o

resultado do programa BOTTLENECK sugere que essas amostragens passaram por uma redução recente no tamanho populacional, pois o valor de P para IAM foi significativo para excesso de heterozigotos em todas elas (TABELA 40). Os valores médios das heterozigosidades também foram altos, concordando com o resultado encontrado.

TABELA 41 - Valores de P para o teste de excesso de heterozigotos de *Salminus hilarii* nos rios da bacia do alto Paraná, dados obtidos pelo teste de Wilcoxon no programa Bottleneck.

	Modelos		
	IAM	TPM	SMM
2011/2013	0,026*	0,515	0,997
Nov/2014	0,021*	0,234	0,911
Fev/2015	0,038*	0,259	0,788

IAM Infinite Allele Model; *TPM* Two Phase Model; *SMM* Stepwise Mutation Model. * $P < 0,05$.

Para as análises utilizando o marcador molecular D-loop, analisamos 61 indivíduos (TABELA 42). O cálculo de índice de fixação (F_{ST}) par-a-par não apresentou diferenciação entre as amostragens após correção de Bonferroni ($P \geq 0,004$) (TABELA 43). A porcentagem de diferenciação, dada pela AMOVA, entre e dentro das populações amostrais foi de 1,14 % e 98,86 %, respectivamente, com F_{ST} global de 0,0113 e P não significativo ($P \geq 0,05$) (TABELA 44).

TABELA 42 - Número de indivíduos de *S. hilarii* utilizados nas análises da Região Controle (D-loop).

Rio	Coleta	Período	Número de amostras	Total
Rio Turvo	Out/2011	Reprodutivo	04	61
	Fev/2012	Reprodutivo	06	
	Nov/2012	Reprodutivo	06	
	Out/2013	Reprodutivo	15	
	Nov/2014	Reprodutivo	20	
	Fev/2015	Reprodutivo	10	

TABELA 43 - Estimativas F_{ST} par-a-par (diagonal abaixo) e valores de P de F_{ST} (diagonal acima).

	Out/2011	Fev/2012	Nov/2012	Out/2013	Nov/2014	Fev/2015
Out/2011	-	0,99099	0,38739	0,54054	0,86486	0,48649
Fev/2012	-0,12109	-	0,76577	0,27027	0,77477	0,80180
Nov/2012	0,03576	-0,05000	-	0,07207	0,51351	0,68468
Out/2013	-0,07508	0,04213	0,12561	-	0,15315	0,04505
Nov/2014	-0,07516	-0,06416	-0,02453	0,03612	-	0,59459
Fev/2015	-0,01433	-0,05481	-0,06755	0,13264	-0,01542	-

Valores de $\alpha \leq 0,008$ após a correção de Bonferroni.

TABELA 44 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.

Fonte da Variação	Porcentagem de Variação	Valor de P - F_{ST}
Entre populações	1,14	--
Dentro de populações	98,86	--
F_{ST} -global	0,0113	0,304

Nível de significância $\alpha = 0,050$.

TABELA 45 - Diversidade haplotípica e Teste de Neutralidade de *S. hilarii* referente à análise da Região Controle (D-loop).

	Diversidade genética					Teste de neutralidade			
	N	H	K	Hd	Pi	Tajima's D	D*	F*	Fs de Fu
Rio Turvo	61	09	2,272	0,809	0,0041	-0,0938	0,8356	0,6166	-0,364

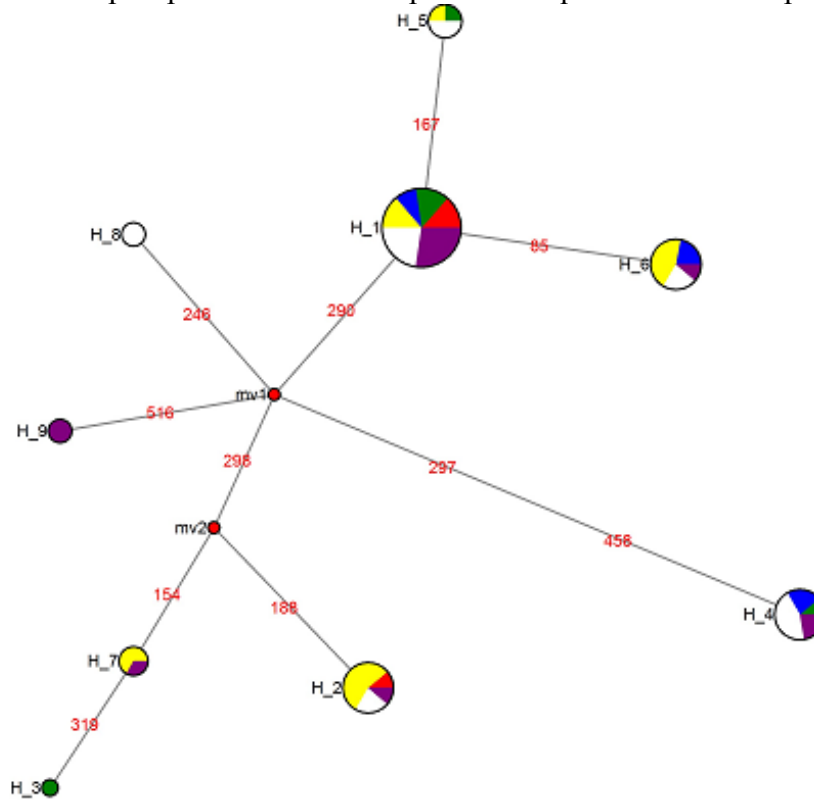
N: tamanho da amostra, H: número de haplótipos, K: média do número de diferenças, Hd: diversidade haplotípica, Pi: diversidade nucleotídica. Nível de significância $P < 0,01$.

Podemos observar na rede haplotípica o compartilhamento de haplótipos entre as populações amostrais (FIGURA 28). A árvore de distância construída no programa MEGA (Neighbor-Joining, Modelo Kimura 2-parâmetros) (FIGURA 29), também não evidenciou uma estruturação, assim como árvore de Máxima Verossimilhança (FIGURA 30), que apresentaram baixos valores de suporte.

A diferenciação encontrada entre as amostragens de *S. hilarii* no rio Turvo trata-se de uma estruturação recente, visto que as taxas mutacionais dos marcadores

microsatélites são mais elevadas em comparação com as do DNAmT. Diante disso, é possível explicar porque não foi encontrado estruturação pelas análises de DNAmT.

FIGURA 28 - Rede haplotípica de *S. hilarii* a partir de sequencias de D-loop.



Haplótipos das populações Out/2011 (vermelho), Fev/2012 (verde), Nov/2012 (azul), Nov/2013 (amarelo), Nov/2014 (branco), Fev/2015 (roxo).

FIGURA 29 - Árvore de distância de *S. hilarii* construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Neighbor-Joining.

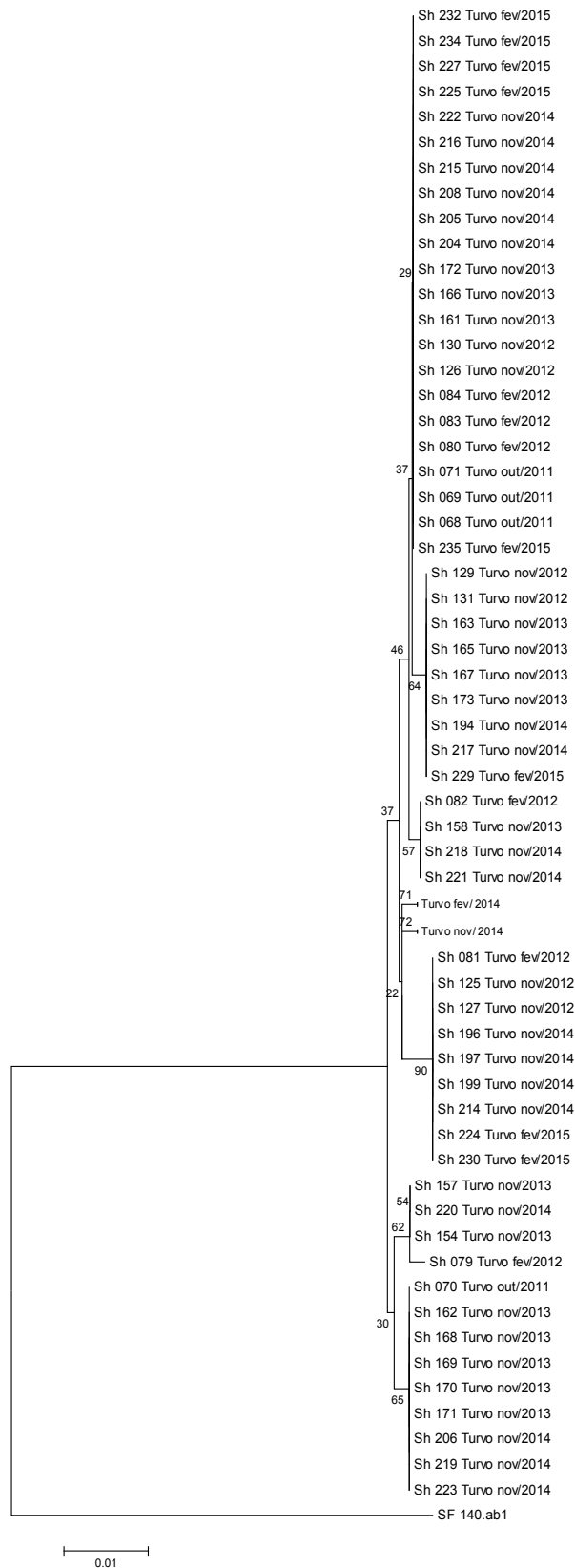
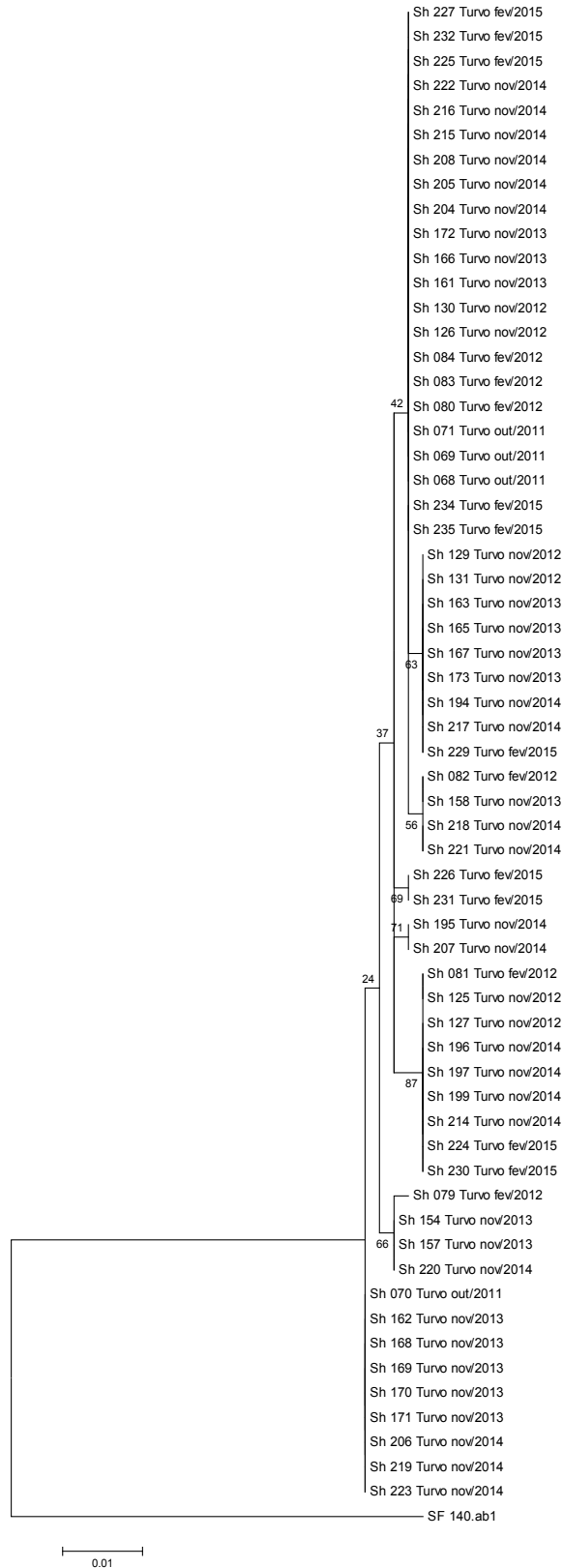


FIGURA 30 - Árvore filogenética de *S. hilarii* construída a partir de sequências de D-loop com valores de bootstrap correspondentes aos métodos de distâncias Máxima Verossimilhança.



5.5 Alto Paraná

Com o intuito de fazer comparações de diversidade genética entre os rios amostrados e para detectar diferenciação genética entre eles, fizemos análises considerando cada rio como uma única população (TABELA 46). Para isso usamos 15 locos de microssatélites.

TABELA 46 - Número de indivíduos de *S. hilarii* utilizados nas análises de microssatélites.

Rio	Número de amostras
Carmo	09
Cubatão	20
Jacaré-pepira	35
Turvo	69
Total	133

O valor do índice F_{ST} entre as amostragens do rio Jacaré-pepira e do Cubatão ficou no limite do nível de significância ($\alpha = 0,01$), indicando a não diferenciação entre elas. Entre as demais amostragens os valores de F_{ST} foram significativos (TABELA 47). O índice de diferenciação de Jost (D_{est}) apresentou valores elevados entre todas as amostragens, exceto entre as do rio Jacaré-pepira e do Cubatão reforçando os resultados obtidos pelo índice F_{ST} (TABELA 48).

TABELA 47 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de R_{ST} abaixo da diagonal e de F_{ST} acima.

	Rio do Carmo	Rib. do Cubatão	Rio Jacaré-pepira	Rio Turvo
Rio do Carmo	-	0,0913*	0,0550*	0,0476*
Rib. do Cubatão	0,1735*	-	0,0165	0,0661*
Rio Jacaré-pepira	0,1249*	0,0295	-	0,0366*
Rio Turvo	0,0784	0,0475*	0,0332	-

* Valores significativos de F_{ST} . Valores de $\alpha \leq 0,01$ após a correção de Bonferroni

TABELA 48 - Diferenciação populacional par-a-par, com valores de D_{est} abaixo da diagonal.

	Rio do Carmo	Rib. do Cubatão	Rio Jacaré-pepira	Rio Turvo
Rio do Carmo	-			
Rib. do Cubatão	0,2653	-		
Rio Jacaré-pepira	0,2062	0,0403	-	
Rio Turvo	0,1506	0,2240	0,1562	-

A Análise de Variância Molecular evidenciou variação entre as populações amostrais de 4,12 %, e 95,88 % dentro das populações amostrais. O valor de F_{ST} -global foi significativo (TABELA 49).

TABELA 49 - Resultados da AMOVA e F_{ST} -global

Fonte da Variação	Porcentagem de Variação	Valor de P - F_{ST}
Entre populações	4,12	--
Dentro de populações	95,88	--
F_{ST} -global	0,041	0,00*

Nível de significância = 0,05. *Valores significantes

O valor de K dado pelo do método de Pritchard et al. (2000) foi igual a dois, porém o $k = 3$ apresenta maior valor em relação ao $k = 2$, e a variância difere pouco. O método de Evanno et al. (2005), evidenciou K igual a 3 (três) (FIGURA 31).

Na análise de atribuição bayesiana realizada no programa STRUCTURE, sem informação *a priori*, foi possível identificar uma estruturação populacional entre os rios. A população amostral dos rios Jacaré-pepira e do Cubatão foram alocadas em um mesmo grupo, sugerindo que não há diferenciação genética entre essas amostragens. Nessa análise também foi possível observar a estruturação dentro do rio Turvo, que já havia sido evidenciada nas análises apresentadas anteriormente para esse rio (FIGURA 32).

FIGURA 31 - Estimativa do número de populações de acordo com o método Evanno et al (2005), evidenciando $k = 3$ (à esquerda) e de Pritchard (2000) evidenciando $k = 5$ (à direita).

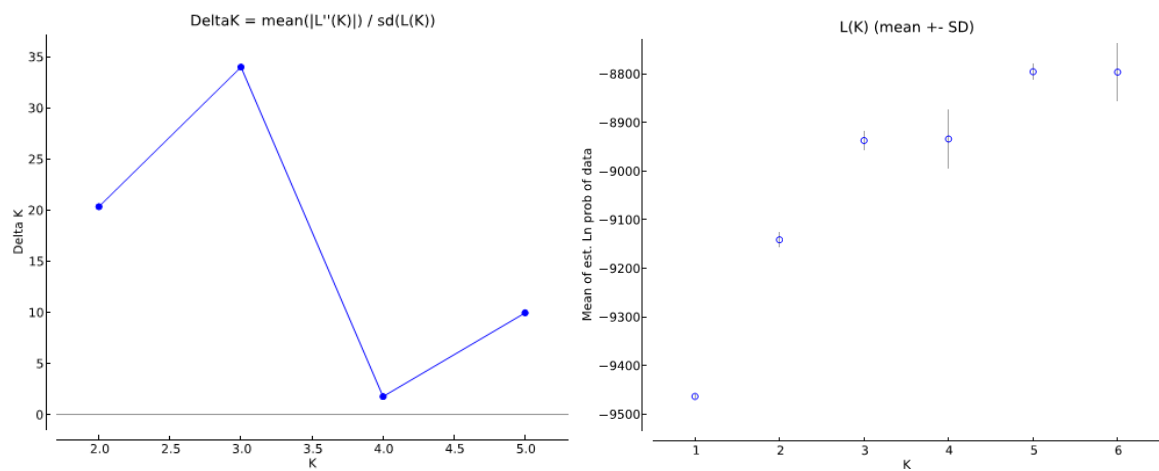
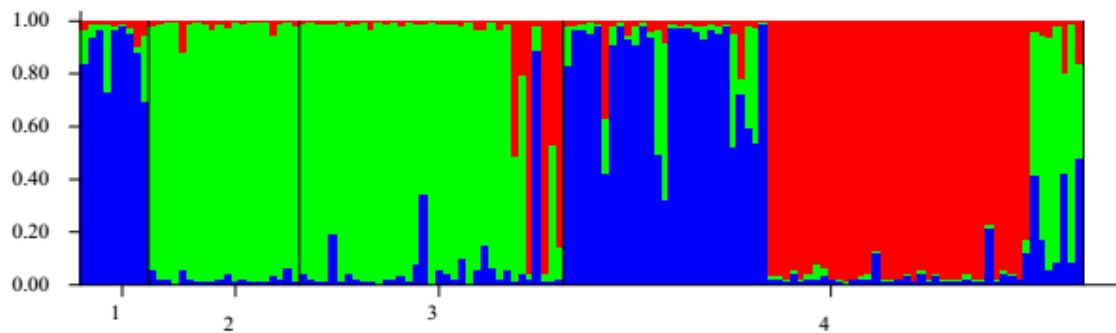
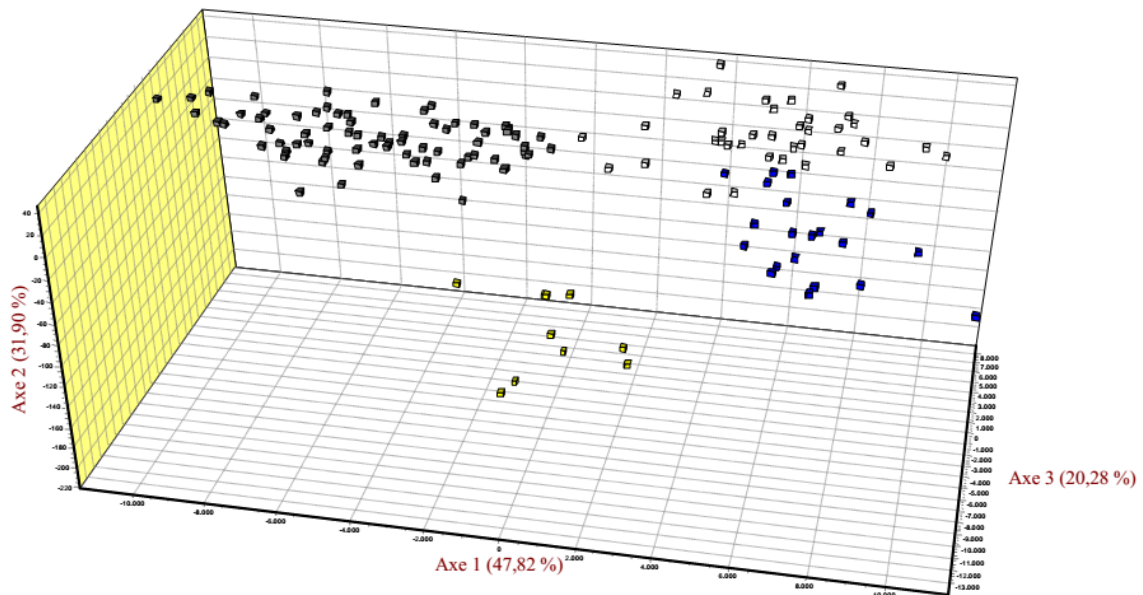


FIGURA 32 - Gráfico de barras obtido pelo STRUCTURE sem informação *a priori*, representando uma população não estruturada de *S. hilarii* no rio Jacaré-pepira. População: 1. rio do Carmo, 2. rib. do Cubatão, 3. rio Jacaré-pepira, 4. rio Turvo.



O gráfico da análise fatorial de correspondência, que agrupa os indivíduos com base na similaridade dos estados alélicos, demonstrou que os indivíduos dos rios Jacaré-pepira e do Cubatão distribuídos mais próximos entre si em relação aos demais (FIGURA 33).

FIGURA 33 - Representação gráfica da análise de fatorial de correspondência.



Rio do Carmo (amarelo), rib. do Cubatão (azul), rio Jacaré-pepira (branco), rio Turvo (cinza).

Os resultados de todas as análises apresentaram a presença de três populações diferenciadas nos quatro rios amostrados na bacia do alto Paraná. Mesmo sabendo que há estruturação dos indivíduos dentro do rio Turvo, eles são geneticamente mais semelhantes entre si que entre os peixes dos outros rios. A estruturação encontrada aponta um isolamento existente pela distância entre os rios, além das barreiras naturais e antrópicas presente entre eles. A não diferenciação entre os indivíduos amostrados no rio Jacaré-pepira e do Cubatão indica a ocorrência de fluxo gênico entre essas populações. Esses dois rios são afluentes do rio Tietê, e apesar de ter uma barragem de usina hidrelétrica entre a foz desses rios, isso parece não ser uma barreira para o fluxo dos indivíduos. A Usina hidrelétrica presente nesse trecho, na represa de Promissão, data da década de 70. A barragem não possui escada para transposição de peixes, mas possui o sistema de eclusa, que permite a passagem de embarcações entre montante e jusante da represa, e vice-versa. É possível que ao abrirem as comportas da eclusa, os peixes que estão no pé da barragem entrem na eclusa e sejam transportados barragem acima, principalmente no período reprodutivo, quando os peixes estão migrando para se reproduzir.

Entre o trecho que deságua o rio do Carmo e o rio Turvo, no rio Grande, possui ao menos três represas, além de estarem separados por vários quilômetros (mais de 350 quilômetros). Essa longa distância é uma barreira efetiva ao fluxo de peixes, ainda mais

sabendo que *S. hilarii* não é comumente encontrado em rios caudalosos. Apesar disso, foi possível observar padrões semelhantes dos genótipos nas amostragens desses dois rios, como demonstrado no gráfico de análise bayesiana.

O isolamento por distância também foi observado por Braga-Silva (2015) ao estudar *Pseudoplatystoma corruscans* em diferentes bacias hidrográficas. Porém Ribolli (2014) não observou isolamento em *Salminus brasiliensis* em trechos com aproximadamente 250 quilômetros de distância entre eles, esse resultado foi justificado pela excelente capacidade migratória de *S. brasiliensis*, que pode percorrer até 51,4 km por dia (HAHN et al., 2011). Silva (2009) também encontrou diferenciação genética de *S. hilarii* por isolamento por distância em outros rios da bacia do alto Paraná. Diferentemente do resultado apresentado por Nunes (2010) para a bacia do alto São Francisco.

Esses dados indicam que, apesar do comportamento migratório da espécie em estudo, a distância é um fator que impede o fluxo entre os indivíduos dessa espécie, formando populações geneticamente diferente uma das outras. Apesar disso, os indivíduos continuam pertencendo à mesma espécie, não ocorrendo o isolamento reprodutivo.

Para a comparação dos dados de diversidades entre os rios, utilizamos os resultados apresentados na TABELA 9 para o rio do Carmo. Devido à falta de diferenciação entre os rios do Cubatão e Jacaré-pepira, consideramos os indivíduos desses rios como sendo uma única população para as próximas análises (população Cubatão-Jacaré). Para o rio Turvo, fizemos uma nova análise com todos os indivíduos coletados em períodos distintos em um único grupo.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) calculados para os 15 locos foram elevados em todas as populações. Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os pares de locos nas populações dos rios do alto Paraná. Vários locos apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostragens do rio Turvo e Cubatão-Jacaré. A causa mais provável dos desvios para esses locos é a presença de alelos nulos. As análises no software MICRO-CHECKER evidenciou que esses locos apresentaram elevadas frequências de alelos nulos. Além disso, o coeficiente de endocruzamento indicou excesso de heterozigotos para esses locos e a presença de estruturação dentro dos rios também pode levar ao resultado encontrado (TABELA 9, TABELA 50 e TABELA 51).

Para caracterizar a diversidade genética, foi estimado o número de alelos (N_a), número efetivo de alelos (N_e), a riqueza alélica (R_a) e a heterozigosidade esperada (H_e). A

média N_a variou de 7,73 (rio do Carmo) a 19,13 (rio Turvo), enquanto que a média do N_e variou de 5,32 (rio do Carmo) a 9,0 (rio Turvo). As médias dos valores de R_a , baseada em oito indivíduos diplóides, variaram de 7,382 (Cubatão-Jacaré) a 8,489 (rio Turvo), e as médias dos valores de H_e de 0,74 (rio do Carmo) a 0,84 (rio Turvo). A média da diversidade genética encontrada variou de entre 0,796 (rio do Carmo) e 0,858 (rio Turvo) (TABELA 9, TABELA 50 e TABELA 51).

TABELA 50 - Dados de microssatélites de *S. hilarii* da amostragem Cubatão-Jacaré.

Loco	N	N_a	N_e	H_e	H_o	P_{HW}	Dg	F_{IS}	P_L	P_S	R_a	PIC
Sh01	55	17	7,65	0,869	0,655	0,001*	0,879	0,256	0,001*	1,000	7,940	0,857
Sh05	55	25	10,6	0,906	0,782	0,000*	0,915	0,146	0,0033	1,000	10,410	0,899
Sh12	54	24	9,36	0,893	0,759	0,000*	0,903	0,159	0,001*	1,000	9,958	0,886
Sh49	52	9	7,38	0,865	0,731	0,0058	0,874	0,164	0,0083	0,9983	6,693	0,850
Sh56	55	16	4,27	0,766	0,727	0,0182	0,773	0,060	0,2217	0,8767	6,472	0,748
Sh85	51	16	6,63	0,849	0,725	0,0290	0,859	0,155	0,0033	1,000	7,940	0,834
Sfra 02	55	25	12,7	0,922	0,709	0,000*	0,932	0,239	0,0017	1,000	9,306	0,917
Sfra 03	55	14	5,53	0,819	0,800	0,0993	0,827	0,033	0,3350	0,8150	6,730	0,802
Sfra 04	55	6	2,61	0,618	0,164	0,000*	0,628	0,739	0,001*	1,000	3,964	0,544
Sfra 05	55	9	3,94	0,747	0,655	0,0276	0,755	0,133	0,0483	0,9833	5,833	0,710
Sfra 10	54	7	2,92	0,659	0,611	0,000*	0,665	0,081	0,2200	0,8700	4,599	0,611
Sfra 13	53	17	9,75	0,897	0,755	0,0156	0,907	0,168	0,001*	1,000	9,568	0,889
Sfra 14	53	16	7,70	0,870	0,774	0,0177	0,880	0,120	0,0150	0,9967	7,589	0,858
Sfra 15	54	27	10,0	0,901	0,741	0,0032	0,911	0,186	0,0033	1,000	9,958	0,893
Sfra 18	55	6	2,95	0,662	0,545	0,0042	0,669	0,185	0,0283	0,9867	3,773	0,605
Média	54	15	6,94	0,816	0,675	-	0,825	0,188	-	-	7,382	0,793

N , número amostral; N_a , número de alelos; H_e , heterozigosidade esperada; H_o , heterozigosidade observada; P_{HW} , desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0,003$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); Dg, diversidade genética; F_{IS} , coeficiente de endocruzamento; P_L , valores de P para o déficit de heterozigotos; P_S , valores de P para o excesso de heterozigotos; R_a , riqueza alélica, N_e , número efetivo de alelos. * valores significantes.

TABELA 51 - Dados de microssatélites de *S. hilarii* da amostragem do rio Turvo

Loco	N	N_a	N_e	H_e	H_o	P_{HW}	Dg	F_{IS}	P_L	P_S	R_a	PIC
Sh01	57	22	9,178	0,891	0,719	0,000*	0,901	0,201	0,001*	1,000	8,934	0,882
Sh05	59	25	15,787	0,937	0,780	0,000*	0,946	0,176	0,001*	1,000	11,115	0,933
Sh12	54	20	11,782	0,915	0,796	0,002*	0,925	0,139	0,005	1,000	10,087	0,909
Sh49	52	15	4,309	0,768	0,365	0,000*	0,779	0,531	0,001*	1,000	6,889	0,742
Sh56	57	20	4,001	0,750	0,667	0,000*	0,758	0,120	0,025	0,986	7,209	0,738
Sh85	33	20	11,773	0,915	0,848	0,004	0,930	0,088	0,065	0,980	10,890	0,909
Sfra 02	56	23	12,062	0,917	0,732	0,000*	0,927	0,210	0,001*	1,000	10,315	0,911
Sfra 03	50	16	9,416	0,894	0,620	0,000*	0,906	0,315	0,001*	1,000	8,384	0,884

Sfra 04	55	18	4,636	0,784	0,564	0,000*	0,794	0,290	0,001*	1,000	7,257	0,758
Sfra 05	56	9	4,836	0,793	0,679	0,007	0,801	0,153	0,018	0,993	5,655	0,763
Sfra 10	55	11	5,118	0,805	0,691	0,094	0,813	0,150	0,023	0,990	5,914	0,778
Sfra 13	58	18	10,529	0,905	0,828	0,003	0,914	0,094	0,026	0,993	9,319	0,898
Sfra 14	43	27	10,076	0,901	0,860	0,001*	0,912	0,056	0,165	0,935	9,725	0,894
Sfra 15	55	36	19,025	0,947	0,782	0,000*	0,958	0,184	0,001*	1,000	12,009	0,945
Sfra 18	58	7	2,540	0,606	0,586	0,035	0,612	0,042	0,378	0,756	3,632	0,541
Média	53,2	19,13	9,005	0,849	0,701	-	0,858	0,183	-	-	8,489	0,832

N, número amostral; *Na*, número de alelos; *H_e*, heterozigiosidade esperada; *H_o*, heterozigiosidade observada; *P_{HW}*, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\alpha < 0,003$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); *Dg*, diversidade genética; *F_{is}*, coeficiente de endocruzamento; *P_L*, valores de *P* para o déficit de heterozigotos; *P_S*, valores de *P* para o excesso de heterozigotos; *Ra*, riqueza alélica, *Ne*, número efetivo de alelos. * valores significantes.

A diversidade genética encontrada foi similar a valores descritos para outras espécies de peixes migradores. Matsumoto e Hilsdorf (2009) encontraram valores de heterozigiosidade variando de 0,72 a 0,83, para *Brycon insignis*. Para *Brycon hilarii* na Bacia do rio Miranda, Sanches e Galetti Jr. (2012) relataram valores de heterozigiosidade inferiores aos encontrados neste trabalho, como *He* variando de 0,66 a 0,67. Silva (2009) encontrou valores de *He* variando de 0,865 a 0,931 em *S. hilarii*. Elevados valores de diversidade genética são essenciais para permitir que as populações tenham viabilidade biológica e se adaptem a alterações ambientais (ALLENORF; RYMAN, 2002; LAIKRE et al., 2005).

O valor de *P* para IAM foi significativo para excesso de heterozigotos para a população Cubatão-Jacaré, sugerindo que essa população passou por uma redução recente em seu tamanho populacional (TABELA 52). Os efeitos de gargalo em uma população foram discutidos previamente.

TABELA 52 - Valores de *P* para o teste de excesso de heterozigotos de *S. hilarii* nos rios da bacia do alto Paraná, dados obtidos pelo teste de Wilcoxon no programa Bottleneck.

	Modelos		
	IAM	TPM	SMM
Carmo	0,751	0,830	0,952
Cubatão-Jacaré	0,017*	0,987	0,999
Turvo	0,063	0,830	1,000

IAM Infinite Allele Model; *TPM* Two Phase Model; *SMM* Stepwise Mutation Model. * $P < 0,05$.

Para as análises utilizando o marcador molecular D-loop, analisamos o total de 117 indivíduos (TABELA 53). O cálculo de índice de fixação (*F_{ST}*) par-a-par somente não

apresentou diferenciação entre as populações do rio do Cubatão e Jacaré-pepira ($P \geq 0,01$) (TABELA 54). A porcentagem de diferenciação, dada pela AMOVA, entre as populações foi de 17,59 % e dentro das populações foi de 82,41 %, com F_{ST} global de 0,175 e P significativo ($P \geq 0,05$) (TABELA 55).

TABELA 53 - Número de indivíduos de *S. hilarii* utilizados nas análises da Região Controle (D-loop).

Rio	Número de amostras
Carmo	07
Cubatão	18
Jacaré-pepira	31
Turvo	61
Total	117

TABELA 54 - Estimativas F_{ST} par-a-par (diagonal abaixo) e valores de P de F_{ST} (diagonal acima)

Rio	Carmo	Cubatão	Jacaré-pepira	Turvo
Carmo	-	0,000*	0,000*	0,000*
Cubatão	0,350	-	0,018	0,000*
Jacaré-pepira	0,371	0,083	-	0,000*
Turvo	0,342	0,150	0,120	-

Nível de significância após correção de Bonferroni = 0,0125.

TABELA 55 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{ST} -global.

Fonte da Variação	Porcentagem de Variação	Valor de P - F_{ST}
Entre populações	17,59	--
Dentro de populações	82,41	--
F_{ST} -global	0,175	0,000*

Nível de significância = 0,0500. * Valor significativo

Os marcadores mitocondriais fornecem apenas informações sobre a linhagem materna, e os padrões de variação detectados no genoma mitocondrial podem diferir dos marcadores nucleares (KOUTSOGIANNOULI et al. 2012). Entretanto, no presente estudo, os dados do D-loop concordaram com os resultados das análises dos locos de microssatélites.

Indicando que a diferenciação populacional observada não é um evento recente, já que os marcadores mitocondriais são mais conservados que os microssatélites.

Para as análises de diversidade, analisamos 556 pb e identificamos 19 haplótipos nas populações dos rios da bacia do alto Paraná, com diversidade haplotípica de 0,897 e diversidade nucleotídica de 0,004. Os testes de neutralidade resultaram em valores negativos para todas as populações, inclusive para a análise geral ($P < 0,10$), sugerindo que essas populações provavelmente passaram por um evento de expansão populacional (TABELA 56).

TABELA 56 - Diversidade haplotípica e Teste de Neutralidade de *S.hilarii*.

Rio	Diversidade genética					Teste de neutralidade			
	N	H	K	Hd	Pi	Tajima's D	D*	F*	Fs de Fu
Carmo	07	03	1,429	0,525	0,0025	-1,486	-1,566	-1,683	0,668
Cubatão	18	07	1,797	0,771	0,0032	-0,396	-0,512	-0,553	-1,765
Jacaré-pepira	31	09	2,654	0,886	0,0047	-0,605	-0,283	-0,451	-1,045
Turvo	61	09	2,272	0,809	0,0041	-1,088	-1,226	-1,405	-5,862
Alto Paraná	117	19	2,56	0,897	0,004	-1,088	-1,226	-1,405	-5,862

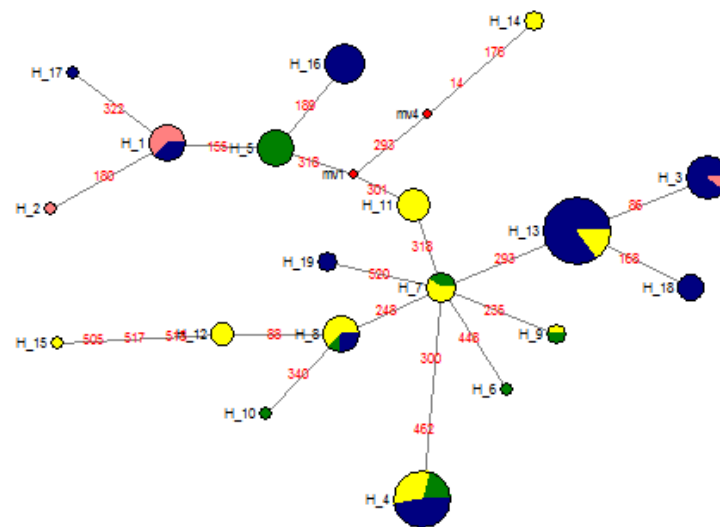
N: tamanho da amostra, H: número de haplótipos, K: média do número de diferenças, Hd: diversidade haplotípica, Pi: diversidade nucleotídica. Nível de significância $\alpha = 0,0500$.

Apesar da diferença entre o tamanho das amostras serem grande, o número de haplótipos não diferiu muito entre os rios amostrados. O rio do Carmo, que possui o menor número amostral, apresentou menor diversidade haplotípica e nucleotídica (0,525 e 0,0025, respectivamente). Lui et al (2012) apresentou em seu trabalho utilizando marcador mitocondrial D-loop em *Parauchenipterus galeatus* na bacia do rio Paraná, diversidade haplotípica de 0,758 e nucleotídica de 0,5. Para *Brycon orbignyanus* foi apresentado diversidade nucleotídica variando de 0,03 a 0,189 em oito localidades da bacia do rio de La Plata (ASHIKAGA et al., 2015).

Podemos observar na rede haplotípica o compartilhamento de haplótipos entre todas as populações amostrais (FIGURA 34). A árvore de distância construída no programa Mega (Neighbor-Joining, Modelo Kimura 2-parâmetros) (FIGURA 35), apresentou baixos valores de suporte e também não evidenciou uma estruturação clara, assim como árvore de

Máxima Verossimilhança (FIGURA 36). Esses resultados não corroboram com os resultados encontrados pelo cálculo de índice de fixação (F_{ST}) e AMOVA. Uma vez que nesses cálculos analisam-se as diferenças nucleotídicas par-a-par, apenas com o intuito de verificar a quantidade de variação existente entre os grupos previamente definidos. Já na construção de árvores filogenéticas, considera-se o enraizamento da árvore em um ancestral comum aos clados. Portanto, as árvores nos dão uma abordagem mais evolutiva (BRAGA-SILVA, 2015).

FIGURA 34 - Rede haplotípica de *S. hilarii* a partir de sequencias de D-loop.



Haplótipos do rio do Carmo (rosa), rib. do Cubatão (verde), rio Jacaré-pepira (amarelo), rio Turvo (azul).

FIGURA 35 - Árvore de distância de *S. hilarii* construída a partir de seqüências de D-loop com valores de *bootstrap* correspondentes ao método de distância Neighbor-Joining. Rio do Carmo (rosa), rib. do Cubatão (verde), rio Jacaré-pepira (amarelo), rio Turvo (azul), Grupo externo *Salminus franciscanus* (preto).

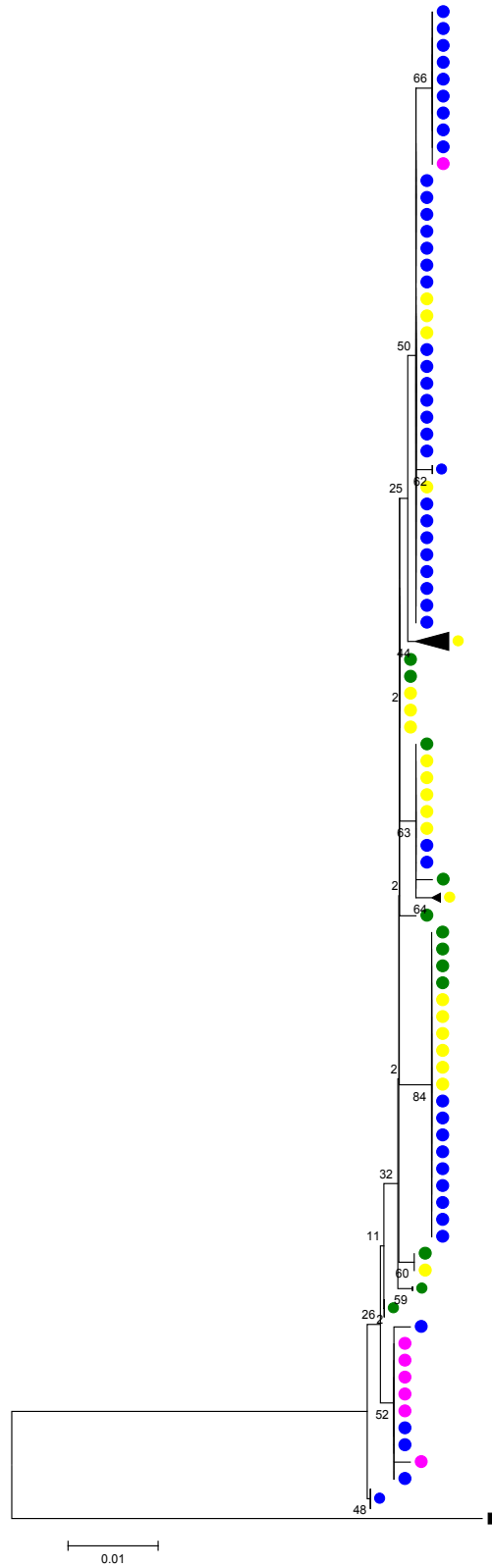
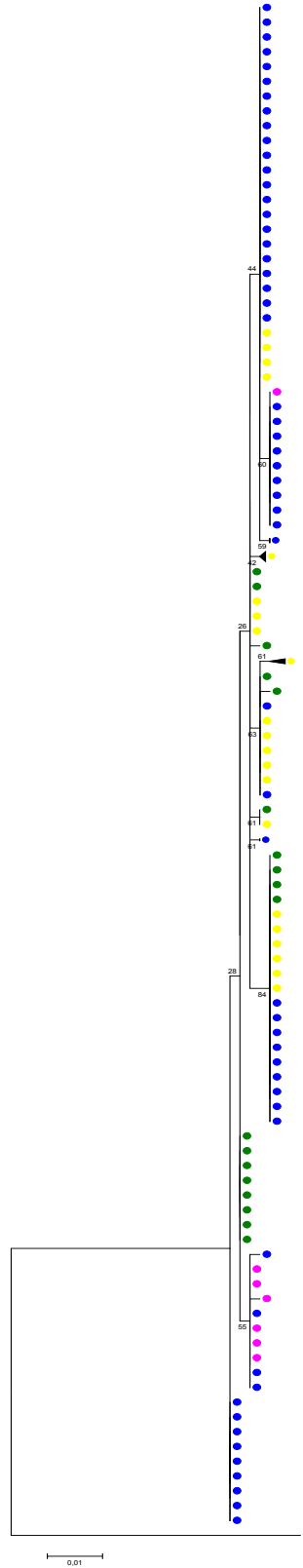


FIGURA 36 - Árvore filogenética de *S. hilarii* construída a partir de sequências de D-loop com valores de *bootstrap* correspondente ao método de Máxima Verossimilhança. Rio do Carmo (rosa), rio do Cubatão (verde), rio Jacaré-pepira (amarelo), rio Turvo (azul), Grupo externo *Salminus franciscanus* (preto).



6 CONCLUSÃO

- O presente trabalho não evidenciou estruturação genética entre os indivíduos amostrados em diferentes períodos no rio do Carmo e no ribeirão do Cubatão, mas evidenciou a existência de estruturação entre as amostragens no rio Jacaré-pepira, assim como no rio Turvo.
- A diferenciação genética encontrada entre as amostragens do rio Turvo merece especial atenção devido às possíveis perdas decorrente da contaminação pelo melão de açúcar em 2013, sendo necessário um acompanhamento sistemático por um longo período de tempo, incluindo mais espécies.
- O presente trabalho evidenciou a existência de diferenciação genética populacional na bacia do alto Paraná. A estruturação encontrada se deve à distância que separa as localidades, servindo como uma barreira para o fluxo gênico. Entretanto, os resultados sugeriram a existência de um único *pool* gênico para os peixes do rio Jacaré-pepira e do ribeirão do Cubatão.
- Os níveis de diversidade genética encontrados em todas as populações amostrais foram similares a outras espécies de peixes migradores Neotropicais.
- Os dados de D-loop foram informativas para avaliar o a diversidade haplotípica das populações amostradas, porém não evidenciou estruturação populacional entre elas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.Y.; CASTRO, R.M.; OLIVEIRA. Multilocus molecular phylogeny of Gasteropelecidae (Ostariophysi: Characiformes) reveals the existence of an unsuspected diversity. **Mol Phylogenet Evol.** n. 69., p. 1209-14, 2013.

ABE, K.T. et al. Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. **MC Evol Biol.** n. 14, p. 152, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Disponível em: <<http://www2.ana.gov.br/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 14 fev 2015.

AGOSTINHO, A.A.; VAZZOLER, A.E.M.; THOMAZ, S.M. The high river Paraná basin: limnological and ichthyological aspects, p. 61 -103. In: TUNDISI, J.G.; TUNDISI, T.M. **Limnology in Brazil.** Rio de Janeiro: ABC/SBL, 1995. 376 p.

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR. H.F. Peixes da bacia do Alto rio Paraná. In: LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais.** São Paulo: Edusp, 1999. p. 374-400.

AGOSTINHO, A. A. et al. 2002. Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. **River Research and Applications**, v. 18, p. 299-306, 2002.

AGOSTINHO, A.A. et al. Migratory fishes of the Upper Paraná River basin, Brazil. In: J. CAROSFELD, J. et al. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status.** World Fisheries Trust/The World Bank/International Development Research Centre: Ottawa, 2003, p. 19-98.

AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ S.M.; GOMES L.C. Threats for biodiversity in the floodplain of the Upper Paraná River: effects of hydrological regulation by dams. **Ecohydrology and Hydrobiology**, v. 4, p. 255–268, 2004.

AGOSTINHO, A. A. et al. . Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. **Reviews in Fish biology and Fisheries**, v. 14, n. 1, p. 11-19, 2004.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil.** Maringá: UEM, 2007.

AGOSTINHO, A. A. et al. Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, Burlington, v. 10, n. 2, p. 174-186, 2007

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

ALLENDORF, F. W.; RYMAN, N. The role of genetics in population viability analysis. In: BEISSINGER, S.R; MCCULLOUGH, D.R. **Population viability analysis.** Chucago: University of Chicago Press, 2002, p. 50-85.

- ARARIPE, J. et al. Dispersal capacity and genetic structure of *Arapaima gigas* on different geographic scales using microsatellite markers. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1-7, jan. 2013.
- ASHIKAGA, Y.F. et al. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environ Biol Fish**, v. 98, p. 1845-1855, feb. 2015.
- AVISE, J.C. et al. Intraspecific Phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Ver. Ecol. Syst.**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2. ed. Sunderland: Sinauer, 2004.
- BANDEL, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.
- BITANYL, S. et al. Species identification of Tanzanian antelopes using DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 442-449, 2011.
- BIRINDELLI, J.L.; GARAVELLO, J.C. Composição, distribuição e sazonalidade da ictiofauna do Ribeirão das Araras, bacia do Alto Rio Paraná, São Paulo, Brasil. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, série Zoológica*, v. 18, n. 1, p. 37-51, 2005.
- BONETTO, A.A.; CASTELLO, H. P. **Pesca y piscicultura em águas continentais de America latina**. Washington, DC.: Secretaria general de La Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1985.
- BONETTO, A.A. The Paraná river system. In: DAVIES, B.R.; WALKER, K.F. **The ecology of river systems**. Dr. W.Junk Publishers, Dordrecht, p. 541-555, 1986.
- BRAGA-SILVA, A. **Influência de fatores históricos e da fragmentação do habitat sobre a diversidade genética de *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829)**. 2015. 88 f. Tese (Doutorado Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP.
- BRITSKI, H.A.; LANGEANI, F. *Pimelodus paranaensis*, sp.n., um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoológica**, v. 5, n. 3, p. 409-417, 1988.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias** (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3. ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF. 1988.
- CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 135–153. 2005.
- CAROLSFELD, J. et al. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. Ottawa: World Fisheries Trust: International Development Research Centre: Washington, D.C.: International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank. 2003
- CARVALHO, M.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Nuclear DNA content of thirty species of Neotropical fishes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 1, p. 47-54, mar. 1998.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2007**. CETESB: São Paulo, 537 p. 2008.

CETRA, M. **Caracterização da assembléia de peixes da bacia do Rio Corumbataí (SP)**. 2003. 88 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP

CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, 1996.

CRAWFORD, N. G. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. **Mol Ecol Resour**, v. 10, n. 3, p. 556-557, 2010.

CRONIN, M.A. et al. Mitochondrial DNA variation in chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of Polymerase Chain Reaction (PCR) products. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 50, p. 708-715, 1993.

DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

DRUMMOND, A.J.; ASHTON, B.; BUXTON, S.; CHEUNG, M.; COOPER, A. 2010. **Geneious v5.5**. Geneious website. Disponível em: <http://www.geneious.com>. Acesso em: 26 set 2014.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 4, p. 23-29, 1996.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Mol Ecol**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Resour**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FERNANDO, C.H.; HOLCIK, J. Fish in reservoirs. **Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie**, Berlin, v. 76, n. 2, p. 149-167, 1991.

FERRAZ DE LIMA, J.A. A pesca no pantanal de Mato Grosso (rio Cuiabá: biologia e ecologia pesqueira). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 2., Recife, 1981. **Anais do ...** Recife: Associação dos Engenheiros de Pesca de Pernambuco, p. 503-529, 1981.

FERREIRA, D.G. et al. Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. **Conserv Genet**, p. 1-16, ago, 2014.

FOWLER, H.W. A collection of fresh-water fishes obtained in eastern Brazil by Dr. Rodolpho von Ihering. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 93, p. 123-199, 1941.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. New York: Cambridge University Press, 2008. Título em inglês: A primer of conservation genetics.

Ttaduzido para o português por Mercival Roberto Francisco e Izeni Pires Farias. Organizado por Pedro Manoel Galetti Junior.

FRASER, D.J.; BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. **Mol Ecol**, v. 10, n. 12, p. 2741-52, dez. 2001.

FROESE; R.; PAULY, D. FishBase. List of Common Names with tabarana. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/>>. Acesso em 18 junho de 2009.

FU, Y.X., LI, W.H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, p. 693-709, 1993.

FU, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915-925, 1997.

GALTIER, N. et al. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal. **Mol Ecol**, v. 18, p. 4541-4550, 2009.

GARUTTI, V. Distribuição longitudinal da ictiofauna em um córrego da região noroeste do estado de São Paulo, Bacia do rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 48, n. 4, p. 747-759, 1988.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil. Subordem Characoidei**. Bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba; ED. Franciscana, v. 1, 1975.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2.): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485-486, 1995.

GOUDLING, M.; SMITH, N.J.H.; MAHAR, D.J. **Floods of fortune: ecology & economy along the Amazon**. New York: Columbia University Press, 1996.

HAHN, L. et al. Use of radiotelemetry to track threatened dorados *Salminus brasiliensis* in the upper Uruguay River, Brazil. **Endangered Species Research**, v. 15, n. 2, p. 103-114, 2011.

HARRIS, G. This is not the end of limnology (or of science): the Word may well be a lot simpler than we think Freshwater Biology, **Osney Mead**, v. 42, p. 689-706, 1999.

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JR, M.P. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v. 126, p. 1-7, 2006.

HAY, D. E. Reproductive biology of Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 42, n. S1, p. s111-s126, 1985.

HOFFMANN, A.A.; PARSONS, P.A. **Extreme environmental change and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press. 1997.

HOLSINGER, K.E. Tajima's D, Fay and Wu's H, Zeng et al.'s E, and Fu's Fs. Attribution-Non Commercial-Share Alike License. <http://creativecommons.org/licenses/by-ncsa/3.0/>. California, USA. 2008.

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

- HONJI, R.M., et al. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). **Fish Physiol Biochem**, v. 35, p. 109–123, 2009.
- JØRGENSEN, H. B. H.; HANSEN, M. M.; LOESCHCKE, V. Spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.) in the southwestern Baltic Sea: do they form genetically distinct spawning waves? **ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil**, v. 62, n. 6, p. 1065-1075, 2005.
- JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation. **Mol Ecol**, v. 17, n. 18, p. 4015-4026, 2008.
- KALINOWSKI, S.T. How many alleles should be used to estimate genetic distances? **Heredity**, 88: 62-65, 2002.
- KALINOWSKI, S. T. et al. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007.
- KASHI, Y.; SOLLER, M. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites Evolution and Applications**, p. 10-23, Oxford University Press, 1999.
- KOUTSOGIANNOULI, E.A., et al. Analysis of MC1R genetic variation in Lepus species in Mediterranean refugia. **Mamm Biol**, v. 77, n. 6, p. 428–433, 2012.
- LACY, R.C. Importance of genetic variation to the viability of mammalian population. **Journal of Mammalogy**, v. 78, p. 320-335, 1997.
- LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 34, n. 2, p. 111-119, 2005.
- LANGANI, F., et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 181-197, 2007.
- LI, Y.C., et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-2465, 2002.
- LIBRADO, P. e ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.
- LIMA, F.C.T., et al. Genera Incertae Sedis in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipurs, Porto Alegre, p. 106-156, 2003.
- LIMA, F.C.T. **Revisão Taxonômica e relações filogenéticas do gênero *Salminus* (Teleostei: Ostrariophysi: Characiformes: Characidae)**. 2006. 263 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.
- LIMA, F.C.T.; BRITSKI, H.A. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 237-244, 2007.

- LIMA-JÚNIOR, S.E. **A Ictiofauna e a qualidade da água em trechos do rio Corumbataí - SP.** 2003. 232 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2003.
- LIS, J. T. Fractionation of DNA fragments by polyethyleneglycol induced precipitation. **Methods in Enzimology**, v. 65, p. 347-353, 1980.
- LECOMTE, N., et al. Tug of war between continental gene flow and rearing site philopatry in a migratory bird: the sex-biased dispersal paradigm reconsidered. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 593–602, 2009.
- LÓPEZ, H. L.; MIQUELARENA, A. M.; MENNI, R. C. **Lista comentada de los peces continentales de la Argentina.** ProBiota, 2003.
- LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais.** São Paulo: Edusp, 1999.
- LUI, R.L., et al. A recent transposition of river involving Parana' and Saõ Franciscobasins: Effects on the genetic variability and structure of the neotropical fish *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes, Auchenipteridae). **Mitochondrial DNA**, v. 1–8, 2012.
- MALABARBA, L.R., et al. **Phylogeny and classification of neotropical fishes.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998.
- MALABARBA, L.R.; WEITZMAN, S.H. Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Com.Mus.Ciênc.PUCRS**, sér. Zool., v. 16, n. 1, p. 67-151, 2003.
- MARTIEN K.K.; GIVENS G.H.; ARCHER E. A note on the ability of Structure to correctly infer the number of populations for Bering-Chuckchi-Beaufort Seas bowhead whales. p.1-8, 2007.
- MATSUMOTO, C.K.; HILSDORF, A.W.S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 395-402, 2009.
- MELO, B.F., et al. The first molecular phylogeny of Chilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) reveals cryptic biodiversity and taxonomic uncertainty. **Mol Phylogenet Evol.**, v. 70, p. 286-95, 2014.
- MEYER, A., et al. Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**, v. 347, n. 6293, p. 550-553, 1990.
- MILLS, L.S.; SMOUSE, P.E. Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. **The American Naturalist**, v. 144, p. 412-431, 1994.
- MONTEIRO, F.P. **Contribuição ao estudo da pesca no Rio Piracicaba.** 1953. 76 p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MORAES FILHO, M.B.; SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae).** Ministério da Agricultura, Divisão de Caça e Pesca, São Paulo, 1955.
- MOYSÉS, C.B.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Restriction Length polymorphism of mitochondrial

DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 401-408, 2002.

NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce**: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 2001.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York: Columbia University Press, 1987.

NUNES, A.G. **Variação genética em *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) na região do Alto Rio São Francisco, MG e contribuições para a conservação do grupo**. 2010. 56p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2010.

OLIVEIRA, A.K.; GARAVELLO, J.C. Fish assemblage composition in a tributary of the Rio Mogi Guaçu River basin, southeastern Brazil. **Iheringia**, v. 93, n. 2, p. 127-138, 2003.

OLIVEIRA, E.J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, L. R., et al. Morphological and genetic evidence for two evolutionary significant units (ESUs) in the South American fur seal, *Arctocephalus australis*. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 6, p. 1451-1466, 2008.

O'REILLY, P.; WRIGHT, J.M. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. **Journal of Fish Biology**, v. 47, p. 29-55, 1995.

OOSTERHOUT, C. *et al.* MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.

ORTÍ, G.; MEYER, A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences, **Systematic Biology**, v. 46, n. 1, p. 75-100, 1997.

PAIVA, M.P. Notas sobre o crescimento, o tubo digestivo e a alimentação da tubarana, *Salminus hilarii* Val., 1829 [sic] (Pisces, Characidae). **Boletim do Museu Nacional**, nova série, Zoologia, v. 196, p. 1-23, 1959

PARSON, W., et al. Species identification by means of the cytochrome b gene. **Int J Legal Med**. V. 114, p. 23–28, 2000.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **The Journal of Heredity**, v. 90, n. 4, p. 502-503, 1999.

PRIOLI, S.M.A.P., et al. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-59, jun 2000.

- PUMITINSEE, P. et al. Temporal genetic heterogeneity of juvenile orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*, Pisces: Serranidae). **Aquaculture research**, v. 40, n. 10, p. 1111-1122, 2009.
- PURRENHAGE, J.L.; NIEWIAROWSKI, P.H.; MOORE, F.B.G. Population structure of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*) in a fragmented landscape. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 235-247, 2009.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.
- REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 381-388, 1997.
- RIBOLLI, J. Caracterização genética populacional do dourado, *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae, Salmininae) na Bacia do alto e médio rio Uruguai. 2014. 121p. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – São Paulo.
- RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989.
- RICO, C.; RICO, I.; HEWEITT, G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. **Proceedings of the Royal Society London Series B**, v. 263, p. 549-557, 1996.
- ROFF, D.A.; BENTZEN, P. The Statistical Analysis of Mitochondrial DNA Polymorphisms: X^2 and the Problem of Small Samples. **Mol. Biol. Evol.**, v. 6, n. 5, p. 539-545, 1989.
- ROSSINI, B. C., et al. Isolation and characterization of microsatellite loci of the freshwater fish *Salminus franciscanus*. **Molecular Ecology Resources**. 2011.
- SANTOS, E. P. **Peixes da água doce**. Belo Horizonte: Itatiaia. 1987.
- SCHUBART, O. A pesca no Mogi-Guassú. **Revista do Arquivo Municipal**, v. 122, p. 121-166, 1949.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.
- SILVA, J.V. Caracterização da diversidade genética da tabarana, *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) (Characiformes: Characidae) da bacia do alto Paraná por marcadores microsatélites. 116 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). 2009. Universidade de Mogi das Cruzes – Mogi das Cruzes – São Paulo.
- SILVA, J. V.; HILSDORF, A. W. S. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 3, p. 437-439, 2011.
- SILVA, C.B.M., et al. GÊNERO *Salminus* (CHARACIFORMES): APENAS CINCO ESPÉCIES? 2013. **Anais do XV Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**. Jequié, BA.
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 407-417. 2001.

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

SO, N.; MAES, G.E.; VOLCKAERT, F.A.M. Intra-annual genetic variation in the downstream larval drift of sutchi catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in the Mekong river. **Biological journal of the Linnean Society**, v. 89, n. 4, p. 719-728, 2006

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585-595, 1989.

TAKAHASHI, E.L.H. Ciclo reprodutivo da tabarana, *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) (Characidae, Salmininae) na região do Baixo rio Sorocaba, SP. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura)–Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006.

TAMURA, K., et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4126-4138, 1984.

VAZZOLER, A.E.M. e MENEZES, N.A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, n. 4, p. 627-640, 1992.

VIANNA, J. A. et al. Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation. **Mol. Ecol.**, v. 15, p. 433-447, 2006.

VILLARES-JUNIOR, G.A., GOMIERO, L.M., GOITEIN, R. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Salminus hilarii* Valenciennes 1850 (Osteichthyes, Characidae) em um trecho da bacia do rio Sorocaba, Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Sci Biol Sci**, v. 29, n. 4, p. 407–412, 2007.

WASKO, A.P.; GALETTI JR, P.M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiologia**, v. 474, p. 131-137, 2002.

WOOTON, R.J. **Ecology of teleost fishes**. London: Chapman and Hall, 1990.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, v. 9, n. 3, p. 395-420, 1965.

WRIGTH, S. **Evolution and the Genetics of Populations**, v. 4: Variability Within and Among Natural Populations. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.

WOYNAROVICH, E. The hydroelectric power plants and the fish fauna. **Verh. Int. Verein. Limnol.**, v. 24, p. 2531-2536, 1991.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZEYL, E. et al. Families in space: relatedness in the Barents Sea population of polar bears (*Ursus maritimus*). **Mol Ecol**, v. 18, p. 735-749, 2009.