



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

ROSANE SILVA DOS SANTOS

**Aspectos filogeográficos de *Leporinus cf. friderici*
e da distribuição da diversidade genética em
Leporinus cf. friderici Paraná e *Megaleporinus
obtusidens* na bacia do Alto Paraná**

São Carlos, SP
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

TESE DE DOUTORADO

**Aspectos filogeográficos de *Leporinus cf. friderici*
e da distribuição da diversidade genética em
Leporinus cf. friderici Paraná e *Megaleporinus
obtusidens* na bacia do Alto Paraná**

Rosane Silva dos Santos

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, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências.

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

São Carlos, SP
2018



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 Rosane Silva dos Santos, realizada em 05/10/2016:

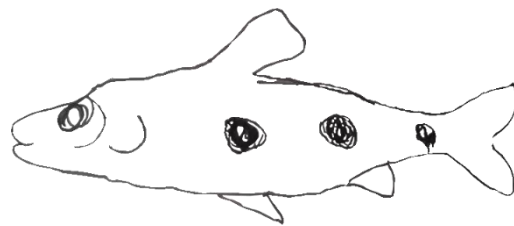
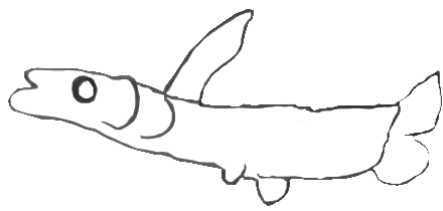
Prof. Dra. Patricia Domingues de Freitas
UFSCar

Prof. Dra. Alexandra Sanches
UFSCar

Prof. Dra. Kátia Maria Ferreira
UFSCar

Prof. Dra. Izeni Pires Farias
UFAM

Prof. Dra. Carla Simone Pavanelli
UEM



Aos meus amados sobrinhos:
Miguel, Ben e João.
Motivos para
continuar.



AGRADECIMENTOS

Quero agradecer às minhas e aos meus ancestrais, que me antecederam e pavimentaram o caminho para que hoje eu pudesse escrever mais uma página da nossa história. Obrigada por terem sobrevivido.

À minha família: meu pai Nadir, meus irmãos Adailton, Adriana e Mazo. Agradecer à minha cunhada Jô. Meus sobrinhos, Miguel, Benjamin e João, pequenos e crescentes motivos para continuar e sempre retornar para casa. Obrigada pelo apoio e por muitas vezes sem entender minha pesquisa e minhas escolhas, as respeitaram. Obrigada por me fazerem sentir que tenho um lugar para chamar de meu, apesar de saberem que sou do mundo. Sem a existência de vocês eu não teria conseguido. Sem o apoio e a confiança que vinham junto com as palavras de que eu conseguiria e que meu espaço existe e irei ocupá-lo. Agradecer à minha mãe (in memoriam) cuja existência fez eu ser quem sou com a garra e o desejo pela vida que tenho.

Às minhas queridas irmãs metralhas: Nazaré Marchi, Priscila Barreto, Consuelo Navarro e Roberta Canário. Agradeço pelo amor que temos umas pelas as outras. Tudo indica que completarei o nosso quadro de doutoras.

Agradecer à professora Dr^a. Patrícia Domingues de Freitas por continuar me aceitando enquanto orientadora. Pela confiança, pelas conversas e puxões de orelha. Pela orientação sempre presente, por abrir as portas do laboratório, da sua casa e família científica para mim. Obrigada pelas danças nos churrascos e por me impressionar enquanto mulher forte que és. Não é fácil fazer ciência, dar aulas, orientar, cuidar de uma família, manter a forma, a saúde e a sanidade

mental em meio a isso tudo. Sua vida e a forma como conduz tudo me inspiram a continuar e ver que é possível.

Ao prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr. pela inspiração e sugestões durante nossas reuniões de laboratório. É impressionante como depois de tantos anos na pesquisa e em sala de aula, o senhor ainda consiga manter o entusiasmo e nos fazer acreditar que nosso projeto tem jeito e de que os nossos dados estão revelando algo importante.

Aos professores e pais científicos, Dr. José Geraldo Aquino de Assis e Dr^a. Moema Belintanni, pelos primeiros passos na ciência e, também pela inspiração em conciliar uma vida pessoal saudável sem detrimento da vida profissional.

Aos meus amigos Cleiton Lima, Elisa Gallo, Catarina Ribeiro, Bruno Cova, Jairo Junior, Antônio Márcio, Gabriela Torres, Rafael Dourado, Roberto Teixeira e tantos outros, pelas energias positivas e palavras de incentivo durante esse processo de formação. Obrigada por estarem presentes nos intervalos que conseguia estar na Bahia.

Aos meus amigos do LabBMC (Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação- UFSCar) pela família que formamos. Pelas trocas diárias de conhecimento e afeto. Aos primeiros revisores desse trabalho: minha Machadão (Dr^a. Carolina Machado), por dividir comigo seu amor pelos processos históricos responsáveis por moldar a diversidade de peixes que conhecemos, por dividir a cama (quando fomos casadas sem ser no papel, hehe), à Brunão (Dr. Bruno Saranholi) pelas trocas e momentos de dissolução ou aparecimento de mais dúvidas, a Karensilla (Dr^a. Karen Rodriguez), pelas contribuições durante o processo de escrita desse manuscrito e pelos porres que tomamos juntas e a Jô (Dr^a. Josiane Ribolli) por ser tão apaixonada pelo que faz e transmitir essa paixão para os que estão à sua volta.

Agradecer ao Ueslei Snipes (Dr. Ueslei Lopes) pelo companheirismo durante a escrita e por dividir momentos de desespero e cansaço regados a muito café e “comidinhas gostosas”. “Tu é fera, Snipes” e “nós vamos vencer”. A Carmen Elena pela irmandade e prontidão sempre que eu gritava: Carmelena vem cá, como é que vê a tabela de atributos no Qgis? Minha escala está errada ou não aparece”, te amo minha bochechuda. Agradecer a Pichu (Ms. Paola Ayala), minha companheira de fundão e frio no laboratório, será que ainda dá tempo de colocarmos uma porta no nosso lab particular?

Obrigada ao Jorgito (Dr. Jorge Ramirez) pelas amostras cedidas para esse trabalho e pelos convites para tomar cerveja e para publicarmos um artigo juntos, o nosso filho ficou lindo. Também não posso esquecer de Braguíssima (Dr^a. Alline Braga), seu curso introdutório possibilitou meus primeiros passos em análises de dados de microssatélites. À Camila Gonçalves pela ajuda com os mapas do segundo capítulo e a Dr^a. Karla Chávez-Congrains pelos gráficos da análise de DAPC.

A lista é grande e quero resumi-la agradecendo aos antigos e aos novos no LabBMC, precisaria de pelo menos mais duas páginas para nomear e elencar como a presença de vocês nos últimos quatro anos da minha vida contribuiu para ser quem sou e chegar a conclusão dessa etapa. Nosso laboratório é imenso e particularmente reúne bons corações. Será o amor pela conservação?

Aos meus amigos de São Carlos que vivenciaram momentos de alegria e desespero comigo. À Viviane Andrade, Aline Costa, Anna Cláudia, Denise Cruz, Marina de Aquino, Taísa Souza, Winnie Damas, Geo, Gabriela de Jesus, Vanessa de Campos, tantas mulheres de luta e correria. Vocês muitas vezes vocês me disseram o quanto eu era uma referência em suas vidas digo que a recíproca é verdadeira. Nos

retroalimentamos nos últimos anos. À Janaína Maldonado (Gatita), que nesse último ano se mostrou uma doce surpresa que aqueceu o meu coração canceriano.

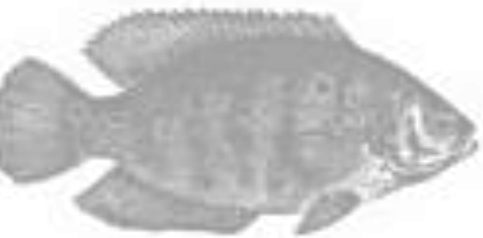
Aos amigos do Sankofa Capoeira e por tabela do SambaSankofa que me ajudaram valorizar ainda mais as minhas raízes e a me conectar com meu passado para ressignificar o futuro. Vocês participaram da construção e do nascimento da mulher negra que me tornei.

Ao governo federal brasileiro que através da CAPES (Código de Financiamento 001) me concedeu uma bolsa de estudo para que conseguisse me manter e sonhar com o fazer ciência. Também pelos auxílios para idas aos congressos, momentos de aprendizado e relaxamento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pela oportunidade de cursar o doutorado e de representar os alunos nos últimos dois anos de curso. E à Ivanildes, secretária do Programa, pelo carinho e por desempenhar sua função com tamanho profissionalismo e em defesa dos alunos.

Agradecer ao Pedro Gallo pelas amostras coletadas e pelos bons papos a respeito dos rios e peixes. Obrigada ao Silvio da AES Tietê que viabilizou junto com a Adriana da Lminética Consultoria a possibilidade de eu coletar amostras em parceria com vocês. Sandro, Silas e Vinicius, juntos formamos a equipe Bandidos Molhados, e coletamos muitas amostras nos rios Tietê e Mogi Guaçu. Obrigada também ao Ricardo pelo envio de outras tantas amostras.

Agradecer também à equipe Chuvisco (Ueslei, Alberto e Seu Máximo) pela animação e momentos excelentes na coleta das amostras do rio Turvo. Pelo nosso lema: "Chuvisco é bom, porque chuvisco traz peixe".



Peixes são iguais a pássaros, só que cantam sem ruído, som que não vai ser ouvido. Voam águias pelas águas, nadadeiras como asas que deslizam entre nuvens.



Peixes, pássaros, pessoas nos aquários, nas gaiolas, pelas salas e sacadas. Afogados no destino de morrer como decoração das casas.



Nós vivemos como peixes, com a voz que nós calamos, com essa paz que não achamos. Nós morremos como peixes, com amor que não vivemos.



Satisfeitos? mais ou menos.



Peixes – Mariana Aydar



LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 Sítios de coleta e as bacias de ocorrência de *Leporinus cf. friderici*. Os círculos coloridos representam as MOTUs encontradas nesse estudo: *L. agassizii* (em vermelho), *L. cf. friderici* Amazonas 1 (em laranja), *L. cf. friderici* Madeira 1 (em roxo), *L. cf. friderici* Paraná (em verde claro), *L. cf. friderici* Paraguai (em verde escuro), *L. piau* São Francisco (em azul escuro), *L. cf. friderici* alto Tapajós (em amarelo) e *L. cf. friderici* Tocantins 1 (em azul claro). Os círculos pretos representam os indivíduos coletados como *L. cf. friderici* Amazonas 2; a estrela preta representa *L. cf. friderici* Mearim; o quadrado preto representa *L. cf. friderici* Tocantins 2; o polígono preto representa *L. cf. friderici* Madeira 2; o triângulo preto representa *L. cf. friderici* Xingú. A - Antiga cachoeira de Sete Quedas e atual barragem de Itaipú. B- Cachoeira do Teotônio no rio Madeira. Mapa criado no programa Q-GIS (<http://www.qgis.org/>). Os números nos pontos de coleta correspondem àqueles presentes na tabela S1.1.....30

Figura 1.2 Árvore de espécies mostrando o relacionamento filogenético de *Leporinus cf. friderici*. As árvores foram geradas usando cinco marcadores moleculares (sequências com aproximadamente 4.900 pb). A topologia corresponde à árvore Bayesiana. Os números nos nós são os valores de *bootstraps* para a Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança e probabilidade posterior para o método Bayesiano. A escala em barra indica as substituições nucleotídicas por sítio.....34

Figura 1.3 MOTUs identificadas a partir das análises de GMYC e BAPS para o clado *Leporinus cf. friderici sensu stricto*.....35

Figura 1.4 Rede de haplótipos construída a partir do método de *Median Joining* para o clado *Leporinus cf. friderici sensu stricto* usando os dados do gene COI. Os pontos pequenos e pretos indicam ausência ou não amostragem dos haplótipos. Os haplótipos são mostrados em diferentes cores de acordo com cada MOTU indicada na legenda.....36

Figura S1.1 Árvore Bayesiana para o gene citocromo oxidase subunidade 1. Os valores nos nós representam a probabilidade posterior.....56

Figura S1.2 Árvore Bayesiana com os dados de Citb. Os valores nos nós representam a probabilidade posterior.....	57
Figura S1.3 Árvore Bayesiana com os dados de Myh6. Os valores nos nós representam a probabilidade posterior.....	57
Figura S1.4 Árvore Bayesiana com os dados de RAG1. Os valores nos nós representam a probabilidade posterior.....	58
Figura S1.5 Árvore Bayesiana com os dados de RAG2. Os valores nos nós representam a probabilidade posterior.....	58

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Localização da bacia do Alto rio Paraná dentro do contexto brasileiro. No detalhe, as sub bacias dos rios Paranaíba, Verdinho, Claro, Grande, Pardo, Mogi Guaçu, Turvo, Tietê, Paraná e Paranapanema. As barras pretas representam algumas das principais Usinas Hidrelétricas (UHEs) implementadas na bacia do alto rio Paraná, região de coleta do presente trabalho. 1- UHE Jaguará, 2- UHE Igarapava, 3- UHE Volta Grande, 4- UHE Porto Colômbia, 5- UHE Euclides da Cunha, 6- UHE Armando Salles (Limoeiro), 7- Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Mogi Guaçu, 8- UHE Marimbondo, 9- UHE Água Vermelha, 10- UHE Edgard Souza, 11- UHE Pirapora do Bom Jesus, 12- UHE Barra Bonita, 13- UHE Álvaro de Souza Lima (Bariri), 14- UHE Ibitinga, 15- UHE Mário Lopes Barreto (Promissão), 16- UHE Nova Avanhandava, 17- UHE Pereira Barreto (Três irmãos), 18- UHE de São Simão, 19- UHE Foz do rio Claro, 20- UHE Salto do rio Verde, 21- UHE Ilha Solteira, 22- UHE Jupia, 23- UHE Jurumirim, 24- UHE Piraju, 25- UHE Chavantes, 26- UHE Ourinhos, 27- UHE de Salto Grande, 28- UHE Canoas II, 29- UHE Canoas I, 30- UHE Capivara, 31- UHE Taquaraçu, 32- UHE Rosana, 33- UHE Porto Primavera, 34- UHE de Itaipu.....	62
---	----

Figura 2.2 A) Indivíduo de <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná coletado no rio Mogi Guaçu. Escala: 10cm. B) Indivíduo de <i>Megaleporinus obtusidens</i> coletado no rio Paraná. Escala: 14cm.....	65
--	----

Figura 2.3 Mapa da bacia do alto rio Paraná indicando os pontos de coleta das amostras de <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná. Os quadrados verdes representam os locais de coletas	
--	--

com suas respectivas numerações, as quais indicam os rios amostrados: Mogi Guaçu (1-4), Grande (5), Turvo (6), Claro/ Paranaíba (7), Verde/Paranaíba (8), Tietê (9-10), Piracicaba/Tietê (11), Paraná (12-14). Para maiores informações ver Tabela 2.1.....70

Figura 2.4 Bacia do alto rio Paraná indicando os sítios de coleta das amostras de *Megaleporinus obtusidens*. Os quadrados azuis representam os pontos de coletas com suas respectivas numerações, as quais indicam os rios amostrados: Mogi Guaçu (1-4), Turvo (5-6), Tietê (7-8), Parapanema (9), Paraná (10-11). Para maiores informações ver tabela 2.2.....71

Figura 2.5 Análise de *clusterização* por Inferência Bayesiana realizada no BAPS para as sequências D-loop de *Leporinus cf. friderici* Paraná a nível de *Clustering of groups of individuals*. Nesse *output* cada indivíduo é representado por uma barra vertical e os possíveis grupos genéticos assumem cores diferenciadas. Aqui, todos os indivíduos pertencem ao mesmo grupo genético configurado na cor vermelha.....82

Figura 2.6 Rede de haplótipos construída com os dados de sequências de D-loop para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná a partir do método de *Median-Joining*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. Os traços representam o número de mutações entre os haplótipos. Os círculos em preto representam haplótipos não amostrados que foram inferidos pela análise (“*median vectors*”). As cores indicam os rios de coleta detalhados na legenda.....83

Figura 2.7 Análise de *Mismatch Distribution* para as 93 sequências D-loop de *Leporinus cf. friderici* Paraná. Distribuição da frequência do número de diferenças entre os pares de sequências (SSD = 0.004620, p = 0.011; índice de Raggedness = 0.02262, p = 0.073).....85

Figura 2.8 Análise de *Bayesian Skyline Plot* mostrando as mudanças no tamanho efetivo populacional pelo tempo geracional nos últimos cem mil anos para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. O eixo X representa o tempo em anos enquanto que o eixo Y traz a informação do produto do tamanho efetivo populacional (N_e) e o tempo de geração por milhão de ano (t) em uma escala log. A linha preta sólida indica a estimativa média e a área em azul o intervalo de maior densidade posterior (95%).....85

Figura 2.9 Análise de DAPC para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. **A)** valores de Critério de Informação Bayesiana (BIC) a partir de diferentes valores k usando os primeiros 20 componentes principais. O valor de K ideal é aquele que apresenta o menor valor de BIC (K = 3). **B)** Gráfico representando os indivíduos como os pontos e os *clusters* com as elipses. Cada *cluster* assume uma cor: *cluster* 1 em verde, *cluster* 2 em vermelho e *cluster* 3 em azul.....86

Figura 2.10 **A)** Quantidade de indivíduos de *Leporinus cf. friderici* Paraná por rio amostrado pertencente a cada *cluster*. **B)** Probabilidade de pertencimento de cada indivíduo a cada *cluster*. Cada barra representa um indivíduo e as cores são referentes *cluster* 1 em verde, *cluster* 2 em vermelho e *cluster* 3 em azul.....87

Figura 2.11 **A)** Análise de correspondência fatorial (FCA) para os indivíduos amostrados, segundo os *clusters* genéticos encontrados na análise de DAPC para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. Os indivíduos pertencentes ao *cluster* 1 estão representados em amarelo; os indivíduos pertencentes ao *cluster* 2 estão representados em azul e os indivíduos pertencentes ao *cluster* 3 estão representados em branco. **B)** Gráfico de barras indicando a porcentagem de contribuição de cada fator para a distribuição dos indivíduos no espaço fatorial. O fator 1 contribuiu com aproximadamente 52% e o fator 2 com 48%.....88

Figura 2.12 Gráfico dos índices das medias dos índices diversidade genética por sub-bacia amostrada para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. (A) número de alelos, (Ae) número de alelos efetivos, (Ho) heterozigiosidade observada, (He) heterozigiosidade esperada, (Ra) riqueza alélica e (Ap) alelos privados.....92

Figura 2.13 Gráfico da distribuição dos alelos em classes de frequências dos *clusters* de *Leporinus cf. friderici* Paraná.....95

Figura 2.14 Análise de *clusterização* por Inferência Bayesiana realizada no BAPS para as sequências D-loop de *Megaleporinus obtusidens* a nível de *Clustering of groups of individuals*. Nesse *output* cada indivíduo é representado por uma barra vertical e os possíveis grupos genéticos assumem cores diferenciadas. Aqui, todos os indivíduos pertencem ao mesmo grupo genético configurado na cor vermelha.....96

Figura 2.15 Rede de haplótipos construída com os dados de sequências de D-loop para a espécie *Megaleporinus obtusidens* a partir do método de *Median-Joining*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. Os traços representam o número de mutações presentes entre os haplótipos. Os círculos em preto representam haplótipos não amostrados que foram inferidos pela análise (median vectors). As cores indicam os rios de coleta detalhados na legenda.....97

Figura 2.16 Análise de *Mismatch Distribution* para as 74 sequências D-loop de *Megaleporinus obtusidens*.....99

Figura 2.17 Análise de *Bayesian Skyline Plot* mostrando o tamanho populacional ao longo do tempo da espécie *Megaleporinus obtusidens*. O eixo X representa o tempo no presente em anos enquanto que o eixo Y traz a informação do produto do tamanho efetivo populacional (N_e) e tempo de geração por milhão de ano (t) em uma escala log. A linha preta sólida indica a estimativa média e a área em azul o intervalo de maior densidade posterior (95%).....99

Figura 2.18 Análise de DAPC para a espécie *Megaleporinus obtusidens*. **A)** valores de Critério de Informação Bayesiana (BIC) a partir de diferentes valores k usando os primeiros 20 componentes principais. O valor de K ideal é aquele que apresenta o menor valor de BIC ($K = 3$). **B)** Gráfico representando os indivíduos como os pontos e os *clusters* como as elipses. Cada *cluster* assume uma cor: *cluster 1* em verde, *cluster 2* em vermelho e *cluster 3* em azul.....100

Figura 2.19 **A)** Gráfico de barras informando a quantidade de indivíduos de *Megaleporinus obtusidens* por rio amostrado pertencente a cada *cluster*. **B)** Gráfico de barras indicando a probabilidade de pertencimento de cada indivíduo a cada *cluster*. Cada barra representa um indivíduo e as cores são referentes aos *cluster 1* em verde, *cluster 2* em vermelho e *cluster 3* em azul.....101

Figura 2.20 **A)** Análise de correspondência fatorial (FCA) para os indivíduos amostrados, segundo os *clusters* genéticos encontrados na análise de DAPC para a espécie *Megaleporinus obtusidens*. Os indivíduos pertencentes ao *cluster 1* estão dentro da elipse amarela; os indivíduos pertencentes ao *cluster 2* estão dentro da elipse vermelha e os indivíduos pertencentes ao *cluster 3* estão dentro da elipse azul. **B)** Gráfico de barras indicando a porcentagem de contribuição de cada fator para a distribuição dos indivíduos

no espaço fatorial. O fator 1 contribuiu com aproximadamente 52.4% e o fator 2 com 47.6%.....102

Figura 2.21 Gráfico dos índices de diversidade genética por sub-bacia amostrada para a espécie *Megaleporinus obtusidens*. (A) número de alelos, (Ae) número de alelos efetivos, (Ho) heterozigidade observada, (He) heterozigidade esperada, (Ra) riqueza alélica e (Ap) alelos privados.....105

Figura 2.22 Gráfico de distribuição dos alelos em classes de frequências dos *clusters* de *Megaleporinus obtusidens*.....110

Figura S2.1 A) Estimativas de [LnP(D)] versus o número de populações (K) analisadas através do programa STRUCTURE para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. **B)** Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno et al. (2005). **C)** Probabilidade de atribuição dos indivíduos para um K = 3. Figura gerada pelo programa CLUMPAK a partir de média (LnProb) = -2529.567e média (*similarity score*) = 0.934.....149

Figura S2.2 Gráfico da distribuição das frequências alélicas, por loco analisado, na espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná.....150

Figura S2.3 A) Estimativas de [LnP(D)] versus o número de populações (K) analisadas através do programa STRUCTURE para a espécie *Megaleporinus obtusidens*. **B)** Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno *et al.* (2005). **C)** Probabilidade de atribuição dos indivíduos para um K = 2. Figura gerada pelo programa CLUMPAK a partir de média (LnProb) = -4845.267 e média (*similarity score*) = 0.984.....151

Figura S2.4 Gráfico da distribuição das frequências alélicas, por loco analisado, na espécie *Megaleporinus obtusidens*.....152

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela S1.1 <i>Vouchers</i> e sítios de coleta de todos os <i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i> analisados.....	48
Tabela S1.2 Número de acesso ao GenBank para todas as sequências nucleotídicas obtidas.....	51
Tabela S1.3 Valores de distância par a par entre e dentro (em negrito) das MOTUs do clado <i>Leporinus</i> cf. <i>friderici sensu stricto</i> usando o modelo K2p. Valores estão em porcentagem.....	55

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 Amostragem de <i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i> Paraná. Os dados fornecidos são referentes aos rios amostrados, latitude, longitude, mês/ano da coleta, número de indivíduos utilizados para as análises com dados de DNA mitocondrial, D-loop (N_{mit}), número de indivíduos utilizados nas análises com os dados de microssatélites (N_{mic}), número total de indivíduos coletados, por ponto amostral (N) e o número referente ao ponto amostral no mapa da Figura 2.3.....	72
Tabela 2.2 Amostragem de <i>Megaleporinus obtusidens</i> . Os dados fornecidos são referentes aos rios amostrados, latitude, longitude, mês/ano da coleta, número de indivíduos utilizados para as análises com dados de DNA mitocondrial, D-loop (N_{mit}), número de indivíduos utilizados nas análises com os dados de microssatélites (N_{mic}), número total de indivíduos coletados, por ponto amostral (N) e o número referente ao ponto amostral no mapa da Figura 2.4.....	73
Tabela 2.3 Valores de F_{st} , entre os pares de sub-bacias amostradas para a espécie <i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i> Paraná com os dados de D-loop.....	81
Tabela 2.4 Índices de diversidade genética calculados para a espécie <i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i> Paraná com os dados de D-loop para cada sub-bacia amostrada.....	84

Tabela 2.5 Valores de F_{st} (diagonal abaixo) e D_{est} (diagonal abaixo) entre os pares de sub-bacias amostradas para a espécie <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná, utilizando os dados de microssatélites.....	90
Tabela 2.6 Valores de F_{st} (diagonal abaixo) e D_{est} (diagonal abaixo) entre os pares de <i>clusters</i> encontrados na análise de DAPC para a espécie <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná utilizando os dados de microssatélites.....	90
Tabela 2.7 Parâmetros de variação genética para a espécie <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná, baseados em sete locos de microssatélites.....	91
Tabela 2.8 Parâmetros de variação genética para a espécie <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná, baseados nos <i>clusters</i> obtidos na análise de DAPC e nos sete locos de microssatélites.....	93
Tabela 2.9 Valores de p para a análise de <i>Bottleneck</i> nos <i>clusters</i> de <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná. segundo os diferentes modelos de mutações. IAM (Alelos Infinitos), SMM (<i>Stepwise Mutation</i>) e TPM (<i>Two Phase Mutation</i>).....	94
Tabela 2.10 Valores de F_{st} , entre os pares de sub-bacias amostrados para a espécie <i>Megaleporinus obtusidens</i> com os dados de D-loop.....	96
Tabela 2.11 Índices de diversidade genética calculados para a espécie <i>Megaleporinus obtusidens</i> com os dados de D-loop.....	98
Tabela 2.12 Valores de F_{st} (diagonal abaixo) e D_{est} (diagonal acima) entre os pares de sub-bacias amostradas para a espécie <i>Megaleporinus obtusidens</i> utilizando os dados de microssatélites. Valores de D_{est} segundo a correção de Bonferroni.....	103
Tabela 2.13 Valores de F_{st} (diagonal abaixo) e D_{est} (diagonal acima) entre os <i>clusters</i> genéticos da espécie <i>Megaleporinus obtusidens</i> utilizando os dados de microssatélites. Valores de D_{est} segundo a correção de Bonferroni.....	103
Tabela 2.14 Parâmetros de variação genética para a espécie <i>Megaleporinus obtusidens</i> , baseados em dez locos de microssatélites.....	106
Tabela 2.15 Parâmetros de variação genética para a espécie <i>Megaleporinus obtusidens</i> , baseados nos <i>clusters</i> obtidos na análise de DAPC.....	107

Tabela 2.16 Valores de p para a análise de <i>Bottleneck</i> nos <i>clusters</i> de <i>Megaleporinus obtusidens</i> , segundo os diferentes modelos de mutações. IAM (Alelos Infinitos), SMM (<i>Stepwise Mutation</i>) e TPM (<i>Two Phase Mutation</i>).....	109
Tabela 2.17 Heterozigosidades médias observadas e esperadas para outras espécies de peixes migradores. Com asterisco as espécies cujos índices foram semelhantes aos encontrados nesse trabalho.....	118
Tabela S2.1 Informações dos locos de microssatélites que foram utilizados em <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná e <i>Megaleporinus obtusidens</i> . Os dados fornecidos são referentes ao nome do <i>primer</i> , o <i>motif</i> de repetição em cada espécie, as sequências <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) de cada loco, com destaque em negrito para a cauda M13 adicionada e a temperatura de anelamento dos <i>primers</i> em cada espécie. Os locos denominados Lobt e Lolar foram desenvolvidos para <i>Megaleporinus obtusidens</i> (OLIVEIRA. 2012; 2015; VILLANOVA. 2015, respectivamente) e os locos Lmac foram desenvolvidos para <i>Megaleporinus macrocephalus</i> (MOREIRA. 2007). *Locos cujo <i>motif</i> de repetição apresentou diferença do <i>motif</i> original descrito nos artigos.....	136
Tabela S2.2 Informações dos locos de microssatélites que foram utilizados em <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná e <i>Megaleporinus obtusidens</i> . Os dados fornecidos são referentes ao nome do <i>primer</i> , o fluoróforo utilizado na amplificação de cada loco para cada espécie. Informações sobre quais locos foram amplificados em cada espécie, temperatura de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados.....	138
Tabela S2.3 Posição dos nucleotídeos polimórficos para os quarenta haplótipos de D-loop identificados para a espécie <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná. Os números correspondem aos sítios polimórficos.....	139
Tabela S2.4 Parâmetros de variação genética para a espécie <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná, baseados nas sub-bacias amostradas em sete locos de microssatélites.....	141
Tabela S2.5 Posição dos nucleotídeos polimórficos para os dezoito haplótipos de D-loop identificados para a espécie <i>Megaleporinus obtusidens</i> . Os números correspondem aos sítios polimórficos.....	145

Tabela S2.6 Parâmetros de variação genética para a espécie <i>Megaleporinus obtusidens</i> Paraná baseados nas sub-bacias amostradas.....	146
---	-----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Ae - Alelos efetivos
BAPS - *Bayesian Analysis of Population Structure*
CEUA/UFSCAR - Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos
cm - Centímetro
COI - Citocromo C Oxidase subunidade I
Citb - Citocromo b
DNA - Ácido desoxirribonucleico
GMYC - *Generalized mixed Yule-coalescent*
HWE - Equilíbrio Hardy-Weinberg
IA - Alelos infinitos
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K2P - Kimura 2-parâmetros
km - Quilômetros
m - Metros
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
mL - mililitros
mM - milimolar
MOTU - Unidades taxonômicas operacionais moleculares (*Molecular Operational Taxonomic Units*)
DNAMt - DNA mitocondrial
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada
Na - Número de alelos
ng - nanogramas
NJ - *Neighbor-Joining*
Nm - número de migrantes
PIC - Conteúdo de informação polimórfica
P_L - p Larger
P_S - p Smaller
RAG1 - *Recombination Activating Gene 1*
RAG2 - *Recombination Activating Gene 2*
SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SMM - *Stepwise mutation model*
SP - São Paulo
SUDEPE - Superintendência para o Desenvolvimento da Pesca
TPM - *two phase mutation model*
UHE - Usina hidrelétrica
µl - microlitro
µM - micromol

SUMÁRIO

I. Apresentação

II. Referências bibliográficas

CAPÍTULO 1

Evidências moleculares de um cenário complexo e oculto em *Leporinus* cf. *friderici*

Resumo	
Abstract	
1.1 Introdução	28
1.2 Material e Métodos	29
1.2.1 Declarações éticas	29
1.2.2 Amostragem dos dados biológicos	30
1.2.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento	31
1.2.4 Análises dos dados	31
1.3 Resultados	33
1.4 Discussão	36
1.5 Considerações finais	40
1.6 Referências bibliográficas	41
1.7 Material Suplementar 1	48
1.7.1 Tabelas	48
1.7.2 Figuras	56

CAPÍTULO 2

Diversidade genética e estrutura populacional em *Leporinus* cf. *friderici* Paraná e *Megaleporinus obtusidens* na bacia do alto rio Paraná

Resumo	
Abstract	
2.1 Introdução	62
2.1.1 Bacia do alto rio Paraná	62
2.1.2 Espécies	63
2.1.3 Impactos dos barramentos	66
2.2 Objetivos	69
2.2.1 Objetivo geral	69
2.2.2 Objetivos específicos	69
2.3 Material e Métodos	70

2.3.1	Declarações éticas.....	70
2.3.2	Amostragem dos dados biológicos.....	70
2.3.3	Extração de DNA e amplificação dos marcadores moleculares (D-loop e microssatélites)	74
2.3.4	Análises com o marcador D-loop	75
2.3.4.1	Estrutura populacional	75
2.3.4.2	Diversidade genética	76
2.3.4.3	Análises demográficas	76
2.3.5	Análises com os marcadores microssatélites	78
2.3.5.1	Estrutura populacional	78
2.3.5.2	Diversidade genética	79
2.3.5.3	Análises demográficas	80
2.4	Resultados	81
2.4.1	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	81
2.4.1.1	Marcador mitocondrial D-loop	81
2.4.1.2	Marcadores microssatélites	86
2.4.1.2.1	Estruturação populacional	86
2.4.1.2.2	Diversidade genética	91
2.4.1.2.3	Aspectos demográficos recentes.....	94
2.4.2	<i>Megaleporinus obtusidens</i>	95
2.4.2.1	Marcador mitocondrial D-loop	95
2.4.2.2	Marcadores microssatélites	100
2.4.2.2.1	Estruturação populacional	100
2.4.2.2.2	Diversidade genética	102
2.4.2.2.3	Aspectos demográficos recentes	109
2.5	Discussão	110
2.5.1	Marcador mitocondrial D-loop	110
2.5.2	Marcadores microssatélites	114
2.6	Considerações finais	119
2.7	Referências bibliográficas	121
2.8	Material Suplementar 2	134
2.8.1	Protocolos	134
2.8.2	Tabelas	136
2.8.3	Figuras	149

I. Apresentação

A biota neotropical aquática continental tem sido moldada por eventos de vicariância e coalescência os quais têm favorecido processos de diversificação e especiação (LUNDBERG et al., 1998). Estudos morfológicos e moleculares da ictiofauna indicam o importante papel do isolamento geográfico das bacias sul-americanas na estruturação e distribuição da diversidade genética de suas espécies e populações (PIRES et al., 2017; SILVA-SANTOS et al., 2018). Nesse contexto, uma espécie amplamente distribuída se torna um excelente modelo para estudar os eventos biogeográficos e os processos evolutivos relacionados à sua diversificação e aos cenários de sua ocorrência.

Os principais sistemas fluviais da América do Sul se modificaram até alcançar a forma atual após vários episódios tectônicos que culminaram com a ascensão do final dos Andes há 10 milhões de anos (SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTÍ, 2001). Considerando esses sistemas fluviais, as espécies de peixes com ampla distribuição refletem os padrões e os processos geomorfológicos e históricos que contribuíram para a configuração atual das bacias e subjacente diversificação interespecífica (BERMINGHAM; MORITZ, 1998). Além disso, a diferenciação intraespecífica também é determinada por processos evolutivos e biogeográficos que ocorrem ao longo do tempo. Os estudos populacionais ajudam a elucidar aspectos relacionados à estrutura genética de uma espécie em uma determinada bacia hidrográfica, e os fatores que permitem ou não a conectividade entre as diferentes populações (CHENG et al., 2013; BRAGA-SILVA; GALETTI JR, 2016; RIBOLLI et al., 2018). Todos estes estudos são essenciais para compreender a biodiversidade e caracterizá-la de forma adequada, sendo de especial relevância para a aplicação de políticas que gerenciem o uso sustentável e manejo de espécies economicamente exploradas e/ou impactadas, com vistas à sua conservação (SANTOS; RUFFINO; FARIAS, 2007).

Considerando a abordagem aqui apresentada, foram realizados estudos genéticos-moleculares em espécimes do gênero *Leporinus* Agassiz, 1829 e *Megaleporinus* Ramirez et al. 2017. Os principais achados e suas implicações estão apresentados nesta tese em dois capítulos: um deles organizado na forma de artigo científico, já publicado e outro no formato de tese, com o artigo ainda em fase de elaboração. Cada capítulo possui uma introdução contextualizando a temática abordada e objetivos, descrevendo a metodologia utilizada e os principais resultados obtidos e sua discussão. Além disso, também são apresentados em cada um dos capítulos seus respectivos resumos, uma sessão final de

considerações relevantes, as referências bibliográficas específicas e o material suplementar.

No primeiro capítulo nós acessamos os padrões filogeográficos da espécie *Leporinus cf. friderici*, amplamente distribuída ao longo de bacias hidrográficas da América do Sul. Sua ampla distribuição suscitou dúvidas com relação à possíveis variações interpopulacionais, e diferenças morfológicas e moleculares intraespecíficas têm sido identificadas nos diversos estudos já publicados com essa espécie. Intitulado “Evidências moleculares de um cenário complexo e oculto em *Leporinus cf. friderici*”, o capítulo 1 dessa tese, testou a existência de diferentes Unidade Operacionais Taxonômicas Moleculares (MOTUs), distribuídas alopatricamente entre as principais bacias hidrográficas brasileiras. Para avaliar esse cenário, foram utilizadas sequências nucleotídicas de genes nucleares e mitocondriais em espécimes provenientes das maiores e principais bacias hidrográficas brasileiras: bacia dos rios Amazonas, Tapajós, Madeira, Tocantins, São Francisco, Paraná e Paraguai. Nós encontramos diferentes MOTUs dentro dessa espécie, resultado que reflete a colocação feita por Reis et al. 2016, de que ainda existe muita diversidade não documentada dentro da ictiofauna neotropical. Os principais resultados obtidos nesse capítulo encontram-se publicados no artigo científico “Molecular evidences of a hidden complex scenario in *Leporinus cf. friderici*”.

O capítulo 2, intitulado “Diversidade genética e estrutura populacional em *Leporinus cf. friderici* Paraná e *Megaleporinus obtusidens* na bacia do alto rio Paraná”, aborda aspectos relacionados aos processos que influenciaram os padrões de distribuição da diversidade genética e estrutura populacional dessas espécies, do ponto de vista histórico e recente. Para isso foram utilizados dois tipos de marcadores moleculares, sendo um a região controle do DNA mitocondrial (D-loop) e diversos locos de microssatélites. Nesse capítulo são discutidos também aspectos relacionados à influência de mecanismos comportamentais na criação de estruturas populacionais e aos distúrbios provocados pela presença de barramentos para espécies migradoras, além da aplicação de medidas mitigatórias dentro das principais sub-bacias dos rios Mogi Guaçu, Grande, Turvo, Tietê, Paranaíba, Paranapanema e Paraná, da bacia do alto rio Paraná.

II. Referências bibliográficas

BERMINGHAM, E.; MORITZ, C. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: Testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 499–517, 1998.

BRAGA-SILVA, A.; GALETTI JR, P. M. Evidence of isolation by time in freshwater migratory fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Hydrobiologia**, v. 765, n. 1, p. 159–167, 2016.

CHENG, F. et al. Microsatellite DNA variation among samples of bronze gudgeon, *Coreius heterodon*, in the mainstem of the Yangtze River, China. **Ichthyological Research**, v. 60, n. 2, p. 165–171, 2013.

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

LUNDBERG, J. G. et al. The stage for neotropical fish diversification a history of tropical south american rivers. In: **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p. 13–48.

PIRES, A. A. et al. Molecular analysis reveals hidden diversity in *Zungaro* (Siluriformes: Pimelodidae): a genus of giant South American catfish. **Genetica**, v. 145, n. 3, p. 335–340, 2017.

REIS, R. E. et al. Fish Biodiversity and Conservation in South America. **Journal of fish biology**, 2016.

RIBOLLI, J. et al. Genetic evidences of non-reproductive shoaling in the freshwater fish *Salminus brasiliensis*. **Hydrobiologia**, v. 815, n. 1, p. 65–72, 2018.

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 33–44, 2007.

SILVA-SANTOS, R. et al. Molecular evidences of a hidden complex scenario in *Leporinus cf. friderici*. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 47, 2018.

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, n. 2, p. 407–417, 2001.

Capítulo 1

Evidências moleculares de um cenário complexo e oculto
em *Leporinus cf. friderici*

ABSTRACT

The megadiversity of the Neotropical ichthyofauna has been associated to recent diversification processes, reflecting in subtle or lacking morphological differentiation between species, challenging the classical taxonomic identification. *Leporinus friderici* occurs in several river basins of South America, and its nominal taxonomic validity has been questioned. Its wide distribution within Brazilian Shield suggests that this species could be genetically structured among the hydrographic basins, despite a sharp morphological similarity. In this study, we performed phylogenetic analyses, based on three nuclear (RAG1, RAG2 and Myh6) and two mitochondrial (COI and Cytb) markers, in specimens morphologically similar to *L. friderici* and related species from different hydrographic basins in South America. Our phylogenetic tree identified four well-supported clades, point out to the existence of taxonomic inconsistencies within this fish group. A clade named *L. cf. friderici sensu stricto* included eight MOTUs (Molecular Operational Taxonomic Units) recently diversified in the Brazilian Shield basins. These results were also confirmed by a single-gene species delimitation analysis. It is suggested that this clade includes a species complex, characterizing taxonomic uncertainties. Another clade recovered only *L. friderici* from the Suriname rivers, validating this nominal species in its type locality. A third no-named clade, characterized by deeper species divergence, recovered five different nominal species interleaved with other undescribed forms previously also recognized as *L. cf. friderici*, indicating taxonomic errors. The fourth clade only included *L. taeniatus*. Our results showed a complex scenario involving the morphotype *L. cf. friderici* and allowed us to address aspects related to evolutionary diversification of this fish group and historical processes involved with, highlighting the importance of revealing hidden biodiversity for the taxonomy and conservationist action plans of these fish.

Keywords: Neotropical fish, MOTUs, fish phylogeny, taxonomic uncertainties, cryptic species

Resumo

A megadiversidade da ictiofauna neotropical tem sido associada a recentes processos de diversificação, refletindo a sutil ou inexistente diferenciação morfológica entre espécies e desafiando a identificação taxonômica clássica. *Leporinus friderici* ocorre em várias bacias hidrográficas da América do Sul e sua validade taxonômica nominal tem sido questionada. A ampla distribuição no escudo brasileiro sugere que esta espécie pode estar geneticamente estruturada entre as bacias hidrográficas. Nesse estudo, realizamos análises filogenéticas, baseadas em três marcadores nucleares (RAG1, RAG2 e Myh6) e dois mitocondriais (COI e Citb), em espécimes morfológicamente similares à *L. friderici* e em espécies relacionadas oriundas de diferentes bacias hidrográficas na América do Sul. Nossa árvore filogenética identificou quatro clados bem apoiados e sugeriu a existência de inconsistências taxonômicas dentro desse grupo de peixes. Um clado nomeado *L. cf. friderici sensu stricto* incluiu oito MOTUs (Molecular Operational Taxonomic Units), as quais passaram por recente diversificação nas bacias do escudo brasileiro. Esses resultados também foram confirmados pela análise de delimitação de espécies baseada em um único gene. Portanto, trata-se de um clado que inclui um complexo de espécies, o qual se caracteriza em incertezas taxonômicas. Um outro clado recuperou apenas exemplares de *L. friderici* do Suriname, validando esta espécie nominal em sua localidade tipo. Um terceiro clado, não nomeado, caracterizado por uma divergência mais profunda das espécies, recuperou cinco espécies nominais diferentes, intercaladas com outras formas, não descritas anteriormente, mas também reconhecidas como *L. cf. friderici*, indicando também inconsistências taxonômicas. O quarto clado incluiu somente *L. taeniatus*. Nossos resultados mostram um cenário complexo envolvendo o morfotipo *L. cf. friderici* e nos permitiu abordar aspectos relacionados à diversificação evolutiva desse grupo de peixes e processos históricos evolutivos na mesma, além de revelar biodiversidade oculta para a taxonomia e para os planos de ações conservacionistas desses peixes.

Palavras chaves: peixes neotropicais, MOTUs, filogenia de peixes, incertezas taxonômicas, espécies crípticas

1.1 Introdução

A ictiofauna de água doce da América do Sul representa um terço de toda a diversidade de peixes conhecida no mundo (REIS et al., 2016). No entanto, essa considerável biodiversidade é relativamente recente, principalmente devido a extensos eventos de especiação durante os últimos dez milhões de anos (HUBERT; RENNO, 2006; ALBERT; REIS, 2011). No último milhão de ano, durante o Pleistoceno, muitos taxóns sofreram divergência, por conta de eventos no Quaternário, tais como rearranjos das drenagens recentes, que levaram a mudanças topográficas (RIBEIRO, 2006). Esses eventos provavelmente refletem uma sutil ou ausência de diferenciação morfológica entre as espécies emergentes, desafiando a identificação taxonômica clássica.

Análises moleculares têm sido amplamente utilizadas na identificação e delimitação de espécies dentro dos peixes neotropicais (CARVALHO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011, 2013; RAMIREZ; GALETTI Jr., 2015; MACHADO et al., 2017), contribuindo para revelar diversidade oculta (PIRES et al., 2017; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI, 2017). Ambos, DNA barcode e estudos filogenéticos têm provido contribuições importantes para o melhor entendimento das relações filogenéticas dentro dos táxons e os processos evolutivos envolvidos na diversificação das espécies (HEBERT et al., 2003; CARVALHO-COSTA et al., 2011; RAMIREZ et al., 2017). Nesse sentido, o DNA mitocondrial e nuclear podem ser usados para definir linhagens genéticas discretas, detectar monofilia recíproca e caracterizar Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs, grupos de sequências ortólogas, gerados por um algoritmo que representam uma linhagem monofilética e que pode corresponder ou não a um taxón) (BLAXTER et al., 2005; JONES; GHOORAH; BLAXTER, 2011).

Leporinus pertence à família Anostomidae e é considerado um dos gêneros mais ricos em espécies dentre os Characiformes, uma ordem predominante nos peixes de água doce da América do Sul (GARAVELLO; BRITSKI, 2003). Estudos morfológicos e moleculares recentes têm mostrado que *Leporinus* não é um gênero monofilético (SIDLAUSKAS; VARI, 2008; RAMIREZ et al., 2016), destacando a necessidade de uma revisão taxonômica profunda nesse grupo. Recentemente, um estudo integrado, abordando dados morfológicos, cromossômicos e moleculares, descreveu o novo gênero *Megaleporinus*, reunindo as espécies de *Leporinus* com maior tamanho corporal em um clado monofilético (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI, 2017). Dentre as demais espécies de *Leporinus* encontra-se *Leporinus friderici* (BLOCK, 1794), com uma ampla

distribuição geográfica, ocorrendo na maioria dos rios da América do Sul (GARAVELLO; REIS; STRAUSS, 1992). Essa ampla distribuição tem sido investigada por muitos autores, que encontraram variações morfológicas (GÉRY; MAHNERT; DLOUHY, 1987; RENNO et al., 1990, 1991; GARAVELLO; REIS; STRAUSS, 1992; SIDLAUSKAS; VARI, 2012) e genéticas (RENNO et al., 1990, 1991) entre populações de *L. friderici*, sugerindo que o morfotipo dessa espécie pode conter um complexo de espécies (SIDLAUSKAS; VARI, 2012). Enquanto *L. friderici* do Suriname e Guiana Francesa têm sido reconhecidos como a espécie tipo (SIDLAUSKAS; VARI, 2012), a nomenclatura provisória *Leporinus cf. friderici* tem sido usada para se referir ao restante dos indivíduos desse morfotipo. No entanto, devido à sua ampla distribuição dentro das bacias do Escudo Brasileiro, pode-se esperar alguns níveis de diferenciação genética dentro de *L. cf. friderici* entre bacias hidrográficas. Variações nos olhos, comprimento do corpo e padrões de coloração já foram relatadas em *L. cf. friderici* das bacias Amazônicas e Paraná-Paraguai (GARAVELLO; REIS; STRAUSS, 1992).

Nesse estudo nós testamos a hipótese de que *L. cf. friderici* consiste em um grupo monofilético formado por diferentes MOTUs separadas, atualmente, nas distintas bacias dentro do escudo brasileiro. Nós realizamos uma análise filogenética usando marcadores nucleares e mitocondriais para confirmar *L. cf. friderici* como um grupo monofilético, e implementamos uma análise de delimitação de espécies, baseada em um único gene, para caracterizar MOTUs. Finalmente, nós inferimos sobre os possíveis processos evolutivos e históricos responsáveis pela diversificação dentro desse grupo.

1.2 Material e Métodos

1.2.1 Declarações éticas

Essa pesquisa foi conduzida conforme os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil) e SISBIO-ICMBio (Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade, Instituto Chico Mendes para Biodiversidade e Conservação, Ministério do Meio Ambiente, Brasil). As amostras biológicas foram obtidas sob as permissões CMBIO/MMA N° 32215 e CEUA n° 3893250615, seguindo todas as recomendações legais. As amostras da Colômbia e Perú foram obtidas por José Ariel Rodrigues e Hernan Ortega, respectivamente, os quais forneceram alíquotas de DNA para esse estudo.

1.2.2 Amostragem dos dados biológicos

Amostras de nadadeira, músculo ou de fígado de 53 indivíduos de *L. cf. friderici*, provenientes de oito bacias hidrográficas do escudo brasileiro, foram coletadas. A figura 1.1 ilustra os locais amostrados. Amostras de *Leporinus agassizii* Steindachner, 1876; *L. boehlkei* Garavello, 1988 e *L. piau* Fowler, 1941 (oriundos dos rios Jaguaribe e São Francisco) e *L. cf. parae* Eigenmann, 1907, também foram obtidas. Ademais, sequências de DNA de *Leporinus desmotes* Fowler, 1914; *Leporinus fasciatus* Bloch, 1794; *Leporinus lacustris* Campos, 1945; *Leporinus octomaculatus* Britski & Garavello, 1993; *Leporinus taeniatus* Lütken, 1875; *Leporinus venerei* Britski & Birindelli, 2008 e *Hypomasticus pachycheilus* Britski, 1976 (RAMIREZ et al., 2016) foram acessadas via GenBank.



Figura 1.1 Sítios de coleta e as bacias de ocorrência de *Leporinus cf. friderici*. Os círculos coloridos representam as MOTUs encontradas nesse estudo: *L. agassizii* (em vermelho), *L. cf. friderici* Amazonas 1 (em laranja), *L. cf. friderici* Madeira 1 (em roxo), *L. cf. friderici* Paraná (em verde claro), *L. cf. friderici* Paraguai (em verde escuro), *L. piau* São Francisco (em azul escuro), *L. cf. friderici* alto Tapajós (em amarelo) e *L. cf. friderici* Tocantins 1 (em azul claro). Os círculos pretos representam os indivíduos coletados como *L. cf. friderici* Amazonas 2; a estrela preta

representa *L. cf. friderici* Mearim; o quadrado preto representa *L. cf. friderici* Tocantins 2; o polígono preto representa *L. cf. friderici* Madeira 2; o triângulo preto representa *L. cf. friderici* Xingú. A - Antiga cachoeira de Sete Quedas e atual barragem de Itaipú. B- Cachoeira do Teotônio no rio Madeira. Mapa criado no programa Q-GIS (<http://www.qgis.org/>). Os números nos pontos de coleta correspondem àqueles presentes na Tabela S1.1.

Todas essas espécies foram incluídas no nosso estudo porque têm sido consideradas proximamente relacionadas à *L. friderici* (GARAVELLO, 1988; BRITSKI; BIRINDELLI, 2008; RAMIREZ et al., 2016). Sequências de *L. friderici* do Suriname (MELO et al., 2016), considerada a localidade tipo da espécie, foram também obtidas no GenBank. As informações relativas aos indivíduos, *vouchers*, IDs e locais de coleta estão apresentadas no material suplementar (Tabelas S1.1 e S1.2).

1.2.3 Extração de DNA, amplificação dos genes e sequenciamento

O DNA total das amostras foi extraído seguindo-se o protocolo convencional que utiliza Fenol, Clorofórmio e Proteinase K (SAMBROOK; FRITISH; MANIATIS, 1989). Para as análises filogenéticas pelo menos um indivíduo de cada bacia hidrográfica foi utilizado. As regiões mitocondriais dos genes Citocromo b (Citb) e Citocromo Oxidase subunidade 1 (COI) foram amplificadas de acordo com Ramirez e Galetti Jr. (2015). Os genes nucleares, ativadores de recombinação 1 e 2 (RAG1 e RAG2) e da cadeia pesada 6 da miosina, isoforma alfa do músculo cardíaco (Myh6) foram amplificados segundo Oliveira et al. (2011). Os produtos de PCR obtidos para ambas as cadeias foram sequenciados em um sequenciador ABI 373xl (Applied Biosystems, Little Chalfont, Reino Unido).

1.2.4 Análises dos dados

As sequências obtidas foram manualmente editadas e alinhadas usando o Bioedit (HALL, 1999) e Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), respectivamente. Todas as sequências foram verificadas quanto a presença de *indels* e *codons* de parada. Os haplótipos dos genes nucleares foram combinados em uma sequência consenso usando

o código de sítios polimórficos e ambíguos da União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC (IUPAC, 1974).

As análises filogenéticas foram conduzidas a partir da concatenação de todas as sequências dos genes mitocondriais e nucleares usando a abordagem de Máxima Parcimônia (MP) implementada no PAUP*4.0 (SWOFFORD, 2003), com 1.000 replicatas de *bootstrap*. Nós também realizamos uma análise de Máxima Verossimilhança (ML), usando RAxML no XSEDE (STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, 2008; STAMATAKIS, 2006), através do servidor online CIPRES Science Gateway (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010), um modelo particionado determinado pelo PartitionFinder (LANFEAR et al., 2012), GTR+G e 1.000 replicatas de *bootstraps*.

Uma árvore de espécies multilocus Bayesiana (BST) foi estimada no *BEAST (Star-BEAST) (HELED; DRUMMOND, 2010), usando 150 milhões de gerações, amostradas a cada 5.000 e um *burni-in* de 300. Os modelos de substituição nucleotídicas foram selecionados segundo o critério Bayesiano, usando o JModeltest 2 (DARRIBA et al., 2012). Os modelos encontrados foram o HKY+I+G, HKY+G, K80+I, K80+I e K80+I para o genes COI, Citb, Myh6, RAG1 and RAG2, respectivamente. O relógio relaxado normal foi usado para todas as partições. Árvores Bayesianas usando todas as sequências foram construídas para cada gene separadamente. Essas árvores foram estimadas usando dez milhões de gerações amostradas a cada 5000 e um *burnin-in* de 10%. O modelo de especiação utilizado foi o *Yule* e os modelos de substituição nucleotídica seguiram os mesmos critérios citados acima (Figuras S1.1 a S1.5). A convergência das cadeias e a estacionaridade dos valores foram checados no TRACER v1.6 (CHATTERJEE, 2011).

Duas diferentes análises de delimitação de espécies baseadas no gene COI foram realizadas a fim de se determinar o número de MOTUs dentro do clado amplamente distribuído no Escudo Brasileiro (*L. cf. friderici sensu stricto*, ver Figura 1.2). Primeiro, o *General Mixed Yule-Coalescent model* (GMYC, PONS et al., 2006) foi usado para determinar os grupos de haplótipos do gene COI. Essa análise foi realizada a partir de um *threshold* único implementada no pacote SPLITS do software R 3.3.3 (R Core Team, 2017). Para essa análise uma árvore ultramétrica foi gerada usando o BEAST 2.3.2 (BOUCKAERT et al., 2014) com um relógio lognormal relaxado, o modelo de especiação *birth and death* e o modelo de substituição nucleotídica HKY escolhido pelo jModeltest 2 (DARRIBA et al., 2012). Um total de 50 milhões de cadeias de Markov e um *burnin-*

in de 10% foram usados. Posteriormente, uma análise Bayesiana de estruturação genética, implementada no software BAPS (CORANDER et al., 2008) foi realizada. O número máximo de grupos geneticamente divergentes (K) foi primeiramente testado para um valor de dez, replicados dez vezes. Os grupos determinados inicialmente, que continham amostras de diferentes bacias, foram submetidos a uma segunda camada de análise no BAPS usando-se K= 1-3, replicados também dez vezes. Essa abordagem hierárquica para análises de agrupamento de sequências é uma maneira de aumentar o poder estatístico e detectar haplogrupos separados que são atribuídos a *clusters* conservados (CHENG et al., 2013). O valor de K mais provável foi escolhido com base nos valores de log (likelihood) e probabilidade posterior. Em seguida, nós consideramos o número final de MOTUs como os grupos concordantes entre as duas diferentes análises e os grupos que apresentaram alopatria e monofilia recíproca.

As distâncias genéticas entre as MOTUs foram calculadas com base no modelo K2P, no programa MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013). Finalmente, uma rede de haplótipos foi gerada a partir do Median Joing (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999) no programa POPART (LEIGH; BRYANT, 2015).

1.3 Resultados

Foram obtidas 127 sequências para os espécimes estudados [63 para o gene COI (557 pb) e 16 sequências para cada um dos outros marcadores analisados – Citb (1005 pb), Myh6 (754 pb), RAG 1 (1477 pb) e RAG 2 (1023 pb)]. Os números de acesso no GenBank são mostrados na Tabela S1.2 do material suplementar.

As árvores filogenéticas geradas pelas análises de MP, ML e BST (Figura 1.2), apresentaram suporte máximo para quatro clados. Um clado recuperou somente *L. friderici* pertencente à bacia do Suriname. Outro clado monofilético, caracterizado por uma recente diversificação dentro do Escudo Brasileiro, foi aqui nomeado como *L. cf. friderici sensu stricto*. Esse clado inclui espécimes de *L. cf. friderici* coletados nas bacias dos rios Amazonas (canal principal), Madeira, Alto Tapajós, Tocantins, Paraguai e Paraná e também *L. agassizii* e os indivíduos de *L. piau* oriundos da bacia do rio São Francisco. O terceiro clado, não nomeado, reuniu os indivíduos de *L. cf. friderici* dos rios Mearim, Tocantins, Turiaçu, Xingú e Madeira, intervaladas com *L. boehlkei*, *L. lacustris*, *L. cf.*

parae, *L. piau*, da bacia do rio Jaguaribe, e *L. veneri*, demonstrando uma antiga diversificação. Por último, um quarto clado recuperando apenas *L. taeniatus* foi obtido.

Dentro do clado *L. cf. friderici sensu stricto*, a análise do GMYC, considerando vinte e três sítios parcimoniosamente informativos e nenhuma inserção ou deleção dentro das sequências de COI, identificou sete MOTUs (CI: 6-7), com um valor significativo de *likelihood* de 10.97 ($p < 0,005$). Essas seis MOTUs correspondem à *L. agassizii*, *L. cf. friderici* Amazônia 1, *L. cf. friderici* Madeira 1, *L. cf. friderici* Paraná, *L. cf. friderici* Paraguai e *L. cf. friderici* alto Tapajós. A sétima MOTU juntou *L. piau* São Francisco e *L. cf. friderici* Tocantins 1 (Figura 1.3). Os resultados da primeira camada da análise BAPS apresentou um valor de $K=4$ como o mais provável, com valores de Log (ml) igual a -554.0008 e 0,93 de probabilidade posterior. O resultado da segunda camada da análise do BAPS foi similar ao resultado encontrado na análise no GMYC, mas recuperou *L. piau* São Francisco e *L. cf. friderici* Tocantins como duas diferentes MOTUs. A análise hierárquica do BAPS pôde separar essas populações, uma vez que informações relacionadas aos locais amostrados foram fornecidas. Diferentemente, o método do GMYC não considera informação *a priori*. Apesar da pequena divergência entre essas duas MOTUs, ambas as linhagens apresentam divergência recente, são reciprocamente monofiléticas e geograficamente isoladas na natureza.

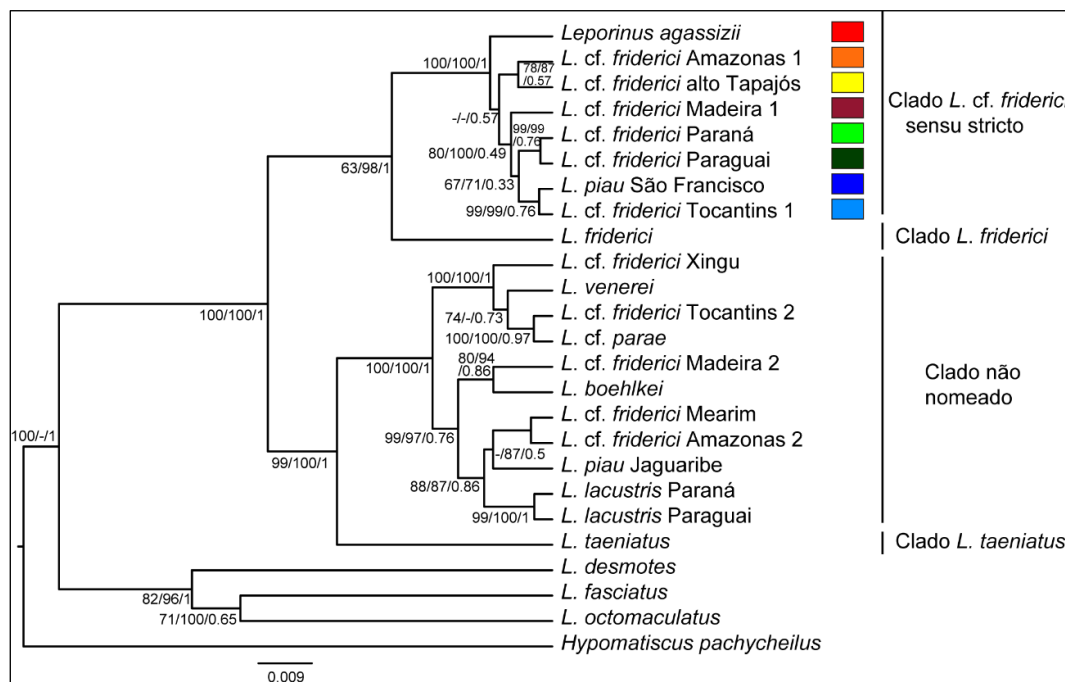


Figura 1.2 Árvore de espécies mostrando o relacionamento filogenético de *Leporinus* cf. *friderici*. As árvores foram geradas usando cinco marcadores moleculares (sequências com

aproximadamente 4.900 pb). A topologia corresponde à árvore Bayesiana. Os números nos nós são os valores de *bootstraps* para a Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança e probabilidade posterior para o método Bayesiano. A escala em barra indica as substituições nucleotídicas por sítio.

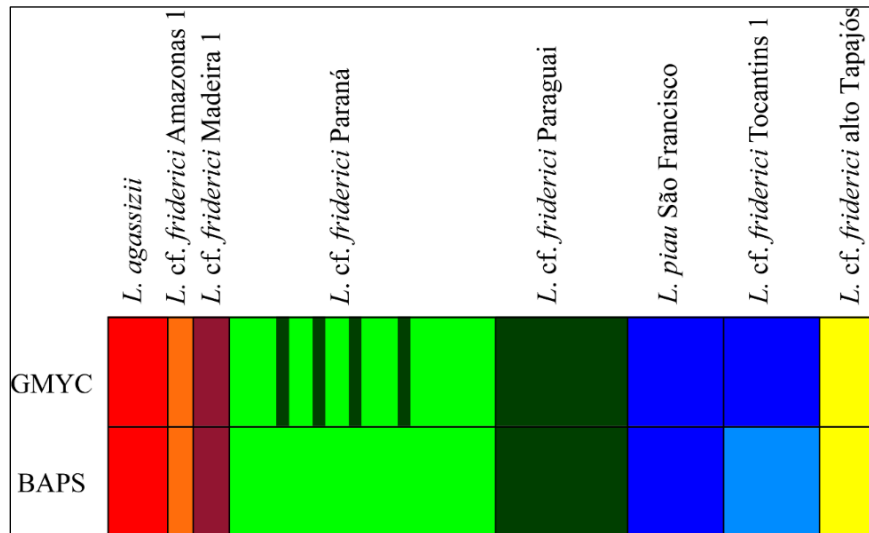


Figura 1.3 MOTUs identificadas a partir das análises de GMYC e BAPS dentro do clado *Leporinus cf. friderici sensu stricto*.

Os valores de distância genética média K2P entre as MOTUs variou de 0,4% à 2,4%. O valor máximo de distância intra MOTU (0,5%) foi observado em *L. agassizii*, enquanto que a distância genética mínima inter MOTUs (0,4%) foi observada entre *L. cf. friderici* Tocantins e *L. piau* São Francisco (Tabela S1.3).

Um total de vinte e sete haplótipos foram obtidos, dentro do clado *L. cf. friderici sensu stricto*. Cada MOTU foi representada por um haplogrupo, com exceção das MOTUs dos rios Paraná e Paraguai que compartilharam um haplótipo. *Leporinus piau* São Francisco e *L. cf. friderici* alto Tapajós foram separadas por apenas um passo mutacional, enquanto que os outros haplogrupos foram conectados por pelo menos dois passos mutacionais (Figura 1.4).

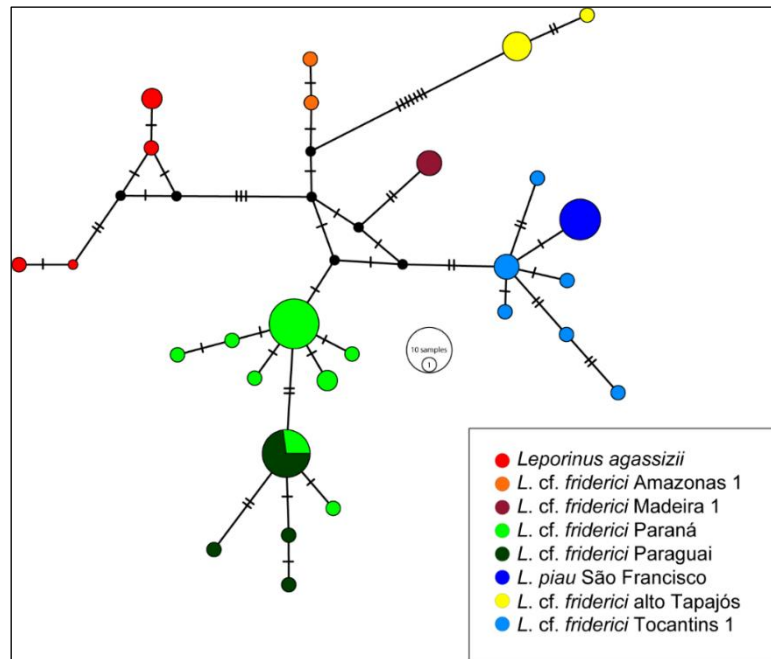


Figura 1.4 Rede de haplótipos construída a partir do método de *Median Joining* para o clado *Leporinus cf. friderici sensu stricto* usando os dados do gene COI. Os pontos pequenos e pretos indicam ausência ou não amostragem dos haplótipos. Os haplótipos são mostrados em diferentes cores de acordo com cada MOTU indicada na legenda.

1.4 Discussão

Nossas análises filogenéticas mostraram que os indivíduos identificados morfologicamente como *L. friderici* constituem um grupo polifilético amplamente distribuído ao longo da América do Sul (Figura 1.2). Os indivíduos coletados como *L. friderici* ao longo das bacias do escudo brasileiro não são coespecíficos com *L. friderici* da localidade tipo, representando espécies diferentes. *Leporinus cf. friderici sensu stricto* constitui um complexo monofilético de espécies distribuídas nos rios das bacias Amazonas, Madeira, alto Tapajós, Tocantins, São Francisco, Paraná e Paraguai. Esse achado representa uma típica situação de diversificação recente, formando um grupo composto por espécies potencialmente crípticas e estritamente relacionadas, revelando incertezas taxonômicas típicas (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI, 2017). Por outro lado, no clado não nomeado, as cinco espécies nominais *L. boehlkei*, *L. cf. parae*, *L. lacustris*, *L. piau* Jaguaribe e *L. venerei* foram intervaladas com indivíduos que se ajustam morfologicamente com a descrição de *L. cf. friderici*. Nesse clado, caracterizado por uma diversificação antiga, o uso do termo *L. cf. friderici* esconde espécies crípticas ainda não descritas. Todas as espécies deste clado compartilham os padrões morfológicos de *L.*

friderici (exemplo: de um a três pontos escuros ao longo da linha lateral, fórmula dentária de 4/4, com exceção de *L. venerei* que possui 4/3, condição única em Anostomidae), o que dificulta a descrição dessas espécies. Além disso, três (*L. lacustris*, *L. parae*, *L. cf. parae* e *L. venerei*) das cinco espécies nominais desse clado têm sido consideradas muito similares em morfologia apresentando corpo profundo, boca terminal, nadadeira anal longa e escura e três manchas na linha lateral (BRITSKI; BIRINDELLI, 2008).

Em geral, os resultados obtidos para *L. cf. friderici sensu stricto* confirmam a nossa hipótese de que existem diferentes MOTUs dentro de *L. cf. friderici*, separadas, atualmente, em distintas bacias, mas nem todos os indivíduos provisoriamente reconhecidos como *L. cf. friderici*, podem ser reunidos em um único grupo monofilético.

Dentro do clado *L. cf. friderici sensu stricto*, *L. agassizii* é claramente uma espécie válida e reconhecidamente diferente de *L. friderici*, principalmente devido a presença de uma faixa longitudinal que se estende desde a nadadeira dorsal até a nadadeira caudal (BIRINDELLI; BRITSKI; LIMA, 2013). *Leporinus agassizii* foi primeiramente descrita para o rio Içá, bacia do alto rio Amazonas (STEINDACHNER, 1876), e posteriormente ela foi encontrada no lago Tefe e rios Nany, Negro e Branco (BIRINDELLI; BRITSKI; LIMA, 2013), todos da mesma bacia. Essa espécie tem sido descrita como restrita à bacia do alto rio Amazonas. Uma análise de parcimônia de endemismo da América do Sul reporta o alto rio Amazonas como um clado separado do restante da drenagem (HUBERT; RENNO, 2006) sugerindo que a elevação dos paleoarcos tenha promovido divergência alopátrica na ictiofauna da região, a qual foi aumentada pelas incursões marinhas.

Em nosso estudo, todos os indivíduos coletados acima das cachoeiras do rio Madeira foram reunidos em uma única MOTU, *L. cf. friderici* Madeira 1, enquanto que os indivíduos abaixo das mesmas foram recuperados na MOTU *L. cf. friderici* Amazonas 1 (Figura 1.3), com exceção dos indivíduos do alto Tapajós (ver abaixo), indicando essas cachoeiras como possíveis barreiras que limitam a distribuição de espécies de peixes na região. Estudos prévios têm reportado evidências de estruturação ao longo da bacia Amazônica (GOULDING, 1979; QUEIROZ et al., 2013). Essa subdivisão foi atribuída a agentes geomorfológicos que permitiram a fragmentação alopátrica e eventos de diversificação (ALBERT; REIS, 2011). No rio Madeira, a cachoeira de Teotônio, parece desempenhar um papel relevante na diversificação da ictiofauna da bacia Amazônica. Essa cachoeira, entre outras corredeiras, tem mantido os rios do alto e baixo Madeira separados e tem sido considerada como barreira geográfica uma vez que limita a

distribuição de espécies de peixes na região (ZANATA; TOLEDO-PIZA, 2004; HUBERT et al., 2007; TORRENTE-VILARA et al., 2011) .

Os efeitos de barreira também podem explicar a presença de *L. cf. friderici* alto Tapajós junto com os indivíduos coletados na sub bacia Juruena-Teles Pires, no alto rio Tapajós (Tabelas S1 e S1.2). Cachoeiras e corredeiras ao longo do rio Tapajós e seus tributários parecem atuar como um barreira para a dispersão de peixes (BRITSKI; GARAVELLO, 2005; BRITSKI; LIMA, 2008; DAGOSTA; DE PINNA, 2017). A região acima da confluência dos rios Juruena e Teles Pires tem sido caracterizada por uma ictiofauna endêmica, diferente da encontrada em outros rios Amazônicos (CARVALHO; BERTACO, 2006; BRITSKI; LIMA, 2008), o que poderia explicar a separação de *L. cf. friderici* alto Tapajós.

Por sua vez, a bacia do rio Tocantins é considerada um sistema independente da bacia Amazônica, já que suas águas fluem diretamente para o Oceano Atlântico (ALBERT; REIS, 2011). Esse fato se refletiu em nossas análises, as quais sugerem que os indivíduos do rio Tocantins corresponderam a um grupo genético diferente (*L. cf. friderici* Tocantins 1). O estabelecimento final do curso moderno do rio Tocantins (1,8Ma) separou definitivamente esse da bacia Amazônica (ROSSETTI; VALERIANO, 2007) e a diferenciação da ictiofauna do Tocantins tem sido associada ao surgimento do arco de Gurupá, das corredeiras de Tucuruí ou à limitada conectividade (HUBERT et al., 2007; HRBEK et al., 2014).

A relação entre *L. piau* São Francisco e *L. cf. friderici* Tocantins 1 observada aqui, pode ser representada por uma história biogeográfica entre as bacias do rio Tocantins e São Francisco, sendo que a baixa divergência genética (0.4%) entre elas provavelmente representa uma diversificação recente. Essas duas bacias hidrográficas apresentam uma extensa região, onde o rio Sapão (bacia do rio São Francisco) compartilha cabeceiras com o rio Galheiros, bacia do rio Tocantins (LIMA; CAIRES, 2011). A existência dessas cabeceiras em comum pode permitir a troca de ictiofauna entre essas bacias. Evidências geológicas mostram que a fronteira ocidental da Serra Geral do planalto de Goiás tem sido gradualmente erodida e poderia ter, potencialmente, promovido eventos de captura de cabeceiras entre os rio São Francisco e Tocantins (LIMA; CAIRES, 2011). Eventos de geodispersão (capturas de cabeceiras, por exemplo) têm sido reivindicados em estudos que usaram ferramentas moleculares (HUBERT et al., 2007; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI, 2017).

Enquanto os indivíduos de *L. piau* da bacia do rio São Francisco foram relacionados ao clado *L. cf. friderici sensu stricto*, os *L. piau* pertencentes à bacia do rio Jaguaribe foram agrupados no clado não nomeado (Figura 1.2), revelando claramente uma inconsistência taxonômica. Fowler (1941) definiu o rio Salgado (bacia do rio Jaguaribe), no estado do Ceará, como a localidade tipo de *L. piau* e incluiu um parátipo no rio Jatobá (bacia do rio São Francisco). Consequentemente, os espécimes do rio São Francisco têm sido usualmente citados como *L. piau* (GARAVELLO; BRITSKI, 2003; CARVALHO et al., 2011). Nossos resultados, no entanto, indicam que os indivíduos da bacia do São Francisco constituem uma espécie diferente do *L. piau* da bacia do rio Jaguaribe, localidade tipo.

Ainda dentro do clado *L. cf. friderici sensu stricto*, uma bem suportada diferenciação entre os espécimes das bacias do alto rio Paraná e Paraguai foi observada, embora alguns indivíduos do alto rio Paraná apresentem haplótipos pertencentes à bacia do rio Paraguai (Figuras 1.3 e 1.4). É possível que tanto *L. cf. friderici* Paraná e *L. cf. friderici* Paraguai chegaram a suas atuais distribuições através de eventos de geodispersão antigos, como capturas de cabeceiras entre o rio Amazonas e os rios Paraná e Paraguai. Na configuração moderna das bacias hidrográficas, a bacia do rio Paraguai apresenta um divisor de águas com os rios Guaporé, Xingú e Tapajós, enquanto que o alto rio Paraná compartilha um divisor de águas nas cabeceiras da bacia do rio Tocantins (ALBERT; REIS, 2011). Esses sistemas hidrográficos já experimentaram uma longa história de grandes eventos de captura de cabeceiras e formação de barreiras semipermeáveis (LUNDBERG et al., 1998) que suportam essa hipótese. A ictiofauna do alto rio Paraná foi separada da do baixo Paraná pelas cachoeiras de Sete Quedas, uma barreira geográfica natural, que já não existe mais. No passado essa barreira isolou o alto rio Paraná, onde a ictiofauna tem se divergido, como já relatado para *Megaleporinus* (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI, 2017) e *Salminus* (CARVALHO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011, 2013; RAMIREZ; GALETTI Jr., 2015; MACHADO et al., 2017) compartilhamento de haplótipos entre *L. cf. friderici* Paraná e *L. cf. friderici* Paraguai são, provavelmente, resultado da remoção dessa barreira natural, quando ocorreu a construção da hidrelétrica de Itaipú. O resultado da barragem foi a inundação de uma extensa área, incluindo a cachoeira de Sete Quedas que permitiu a conexão entre as ictiofaunas do baixo e alto rio Paraná, facilitando o contato entre linhagens mitocondriais

diferenciadas desde a formação desta cachoeira (JÚLIO JÚNIOR et al., 2009; PRIOLI et al., 2012).

1.5 Considerações finais

Nosso estudo mostrou pelo menos dois cenários principais relacionados à diversidade oculta em *L. cf. friderici*, como provisoriamente usado. Primeiro: *L. cf. friderici sensu stricto* consiste em um clado monofilético que reúne oito MOTUs e que, potencialmente, inclui um verdadeiro complexo de espécies, distribuídas em todas as bacias do escudo brasileiro, caracterizadas por uma diversificação recente. Essa estrutura parece estar relacionada a agentes geomorfológicos, determinando a atual estrutura hidrográfica. O significado taxonômico desse clado é uma questão aberta, solicitando estudos complementares para resolver essa situação típica de incertezas taxonômicas. Segundo: espécies crípticas não descritas sob a denominação *L. cf. friderici*, provavelmente devido às semelhanças morfológicas que caracterizam os clados aqui estudados (exceto o clado *L. taeniatus*), formam um clado, aqui não nomeado, caracterizado por uma diversificação relativamente antiga em nossa opinião. No entanto, estas novas MOTUs mostram divergências filogenéticas profundas e são entrelaçadas com outras espécies nominais válidas (*L. veneri*, *L. boehlkei*, *L. lacustris*, *L. piau* e *L. cf. parae*), suportando-as como potenciais novas espécies.

Em geral, nossos resultados tem um significado importante para a taxonomia e o conhecimento evolutivo desse grupo de peixes, bem como para a sua conservação. Além disso, esse cenário indica que *L. cf. friderici sensu strictu* se constitui um excelente modelo filogeográfico no estudo de processos evolutivos e de especiação que atuam nas bacias da América do Sul. Apesar do seu comportamento migratório, *L. cf. friderici* não pode ser considerado um único estoque genético, mesmo dentro da mesma bacia hidrográfica (por exemplo, a bacia Amazônica), sendo necessário, portanto, que para qualquer esforço de conservação toda a sua diversidade seja considerada. Para um entendimento mais completo do cenário apresentado, o *status* taxonômico de cada MOTU revelada aqui precisa ser avaliado usando-se dados morfológicos e moleculares em uma abordagem, preferencialmente, integrativa.

1.6 Referências bibliográficas

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Los Angeles, California: University of California Press, 2011.

BANDELT, H.-J. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.

BIRINDELLI, J. L. O.; BRITSKI, H. A.; LIMA, F. C. T. New Species of *Leporinus* from the Rio Tapajós Basin, Brazil, and Redescription of *L. moralesi* (Characiformes: Anostomidae). **Copeia**, n. 2, p. 238–247, 2013.

BLAXTER, M. et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1935–1943, 2005.

BLOCK, M. E. **Naturgeschichte der ausländischen Fische**. Berlin, 1794.

BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 4, 2014.

BRITSKI, H. A. Sobre uma nova espécie *Leporinus* da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 6, p. 87–89, 1976.

BRITSKI, H. A.; BIRINDELLI, J. L. O. Description of a new species of the genus *Leporinus* Spix (Characiformes: Anostomidae) from the rio Araguaia, Brazil, with comments on the taxonomy and distribution of *L. parae* and *L. lacustris*. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 1, p. 45–51, 2008.

BRITSKI, H. A.; GARAVELLO, J. C. Uma nova espécie de *Leporinus* Agassiz, 1829, da Bacia Amazônica (Ostariophysi: Characiformes: Anostomidae). **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS: Série Zoologia**, v. 18, n. 2, p. 75–83, 2005.

BRITSKI, H. A.; LIMA, F. C. T. A New Species of *Hemigrammus* from the Upper Rio Tapajós Basin in Brazil (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Copeia**, v. 2008, n. 3, p. 565–569, 2008.

CAMPOS, A. A. Contribuição ao estudo das espécies brasileiras do gênero *Leporinus*. **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia** v. 5, n. 16, p. 141-158, 1945.

- CARVALHO-COSTA, L. F. et al. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 59, n. 1, p. 177–194, 2011.
- CARVALHO, D. C. et al. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial DNA**, v. 22, p. 80–86, out. 2011.
- CARVALHO, T. P.; BERTACO, V. A. Two new species of *Hyphessobrycon* (Teleostei: Characidae) from upper rio Tapajós basin on Chapada dos Parecis, central Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 3, p. 301–308, 2006.
- CHATTERJEE, A. P. Tracer diffusion in fibre networks: The impact of spatial fluctuations in the fibre distribution. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 23, n. 37, 2011.
- CHENG, L. et al. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 5, p. 1224–1228, 2013.
- CORANDER, J. et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 539, 2008.
- DAGOSTA, F. C. P.; DE PINNA, M. C. C. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographical units. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. September, p. 1–24, 2017.
- DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772, ago. 2012.
- EIGNMANN, C. H.; OGLE, F. An annotated list of characin fishes in the United States National Museum and the Museum of Indiana University, with descriptions of new species. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 33, n. 1556, p. 1-36, 1907.
- FOWLER, H. W. Academy of Natural Sciences 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.
- GARAVELLO, J. C. A New Species of the Genus *Leporinus* Spix from the Rio Meta, Colombia, South America (Pisces, Ostariophysi, Anostomidae). **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 140, n. 2, p. 143–149, 1988.

GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A. Family Anostomidae. In: **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 71–84.

GARAVELLO, J. C.; REIS, S. F. DOS; STRAUSS, R. E. Geographic variation in *Leporinus friderici* (Bloch) (Pisces: Ostariophysi: Anostomidae) from the Paraná-Paraguay and Amazon River basins. **Zoologica Scripta**, v. 21, n. 2, p. 197–200, 1992.

GÉRY, J.; MAHNERT, V.; DLOUHY, C. Poisson Characoïdes non Characidae du Paraguay (Pisces, Ostariophysi). **Revue Suisse De Zoologie**, v. 94, n. 2, p. 357–464, 1987.

GOULDING, M. **Ecologia da pesca do rio Madeira**. Manaus, CNPQ/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1979, p. 172.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1512, p. 313–21, 2003.

HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 3, p. 570–580, 2010.

HRBEK, T. et al. A new species of river dolphin from Brazil or: how little do we know our biodiversity. **PloS one**, v. 9, n. 1, 2014.

HUBERT, N. et al. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2115–2136, 2007.

HUBERT, N.; RENNO, J.-F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414–1436, 2006.

IUPAC. Abbreviations and symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their constituents. **International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry**, v. 40, p. 277–331, 1974.

JONES, M.; GHOORAH, A.; BLAXTER, M. JMOTU and taxonator: Turning DNA

barcode sequences into annotated operational taxonomic units. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

JÚLIO JÚNIOR, H. F. et al. A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 709–718, 2009.

LANFEAR, R. et al. PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 6, p. 1695–1701, 2012.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.

LIMA, F. C. T. DE; CAIRES, R. A. Peixes da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins, bacias dos Rios Tocantins e São Francisco, com observações sobre as implicações biogeográficas das “águas emendadas” dos Rios Sapão e Galheiros. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 231–250, 2011.

LUNDBERG, J. G. et al. The stage for neotropical fish diversification a history of tropical south american rivers. In: **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p. 13–48.

MACHADO, C. D. B. et al. DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characiformes). **Systematics and Biodiversity**, v. 15, n. 4, p. 372–382, 4 jul. 2017.

MELO, B. F. et al. Molecular phylogenetics of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 102, p. 189–201, 2016.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. **Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees**. Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, LA: IEEE, 2010

OLIVEIRA, C. et al. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 275, 2011.

PEREIRA, L. H. G. et al. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná

Basin of Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 22, p. 87–96, 2011.

PEREIRA, L. H. et al. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, v. 14, n. 1, p. 20, 2013.

PIRES, A. A. et al. Molecular analysis reveals hidden diversity in *Zungaro* (Siluriformes: Pimelodidae): a genus of giant South American catfish. **Genetica**, v. 145, n. 3, p. 335–340, 2017.

PONS, J. et al. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology**, v. 55, n. 4, p. 595–609, 2006.

PRIOLI, A J. et al. Mitochondrial D-loop nucleotide diversity in *Astyanax* (Osteichthyes, Characidae) from the upper Paraná and upper Paraguay River basins. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 2, p. 1064–74, 2012.

QUEIROZ, L. J. et al. **Peixes do rio madeira**. 1. ed., v. 1, São Paulo, 2013.

RAMIREZ, J. L. et al. Testing monophyly of the freshwater fish *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) through molecular analysis. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 3, p. 1204–1214, 2016.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L. O.; GALETTI, P. M. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): Diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 107, p. 308–323, 2017.

RAMIREZ, J. L.; GALETTI, P. M. DNA barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta* Cope 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 93, p. 77–82, 2015.

REIS, R. E. et al. Fish Biodiversity and Conservation in South America. **Journal of fish biology**, 2016.

RENNO, J. F. et al. Intraspecific Genetic Differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in French-Guiana and Brazil - a Genetic Approach to the Refuge Theory. **Journal of Fish Biology**, v. 36, n. 1, p. 85–95, 1990.

RENNO, J. F. et al. Polymorphism of mitochondrial genes in populations of *Leporinus friderici* (Bloch , 1794): intraspecific structure and zoogeography of the Neotropical fish.

Genetica, p. 137–142, 1991.

RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 225–246, 2006.

ROSSETTI, D. F.; VALERIANO, M. M. Evolution of the lowest amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. **CATENA**, v. 70, n. 2, p. 253–265, jul. 2007.

SAMBROOK, J.; FRITISH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SIDLAUSKAS, B. L.; VARI, R. P. Phylogenetic relationships within the South American fish family Anostomidae (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 154, n. 1, p. 70–210, 2008.

SIDLAUSKAS, B. L.; VARI, R. P. Diversity and distribution of anostomoid fishes (Teleostei : Characiformes) throughout the Guianas. **Cybium**, v. 36, n. 1, p. 71–103, 2012.

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. et al. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. **Systematic biology**, v. 57, n. 5, p. 758–71, 2008.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688–2690, 2006.

STEINDACHNER, F. Ichthyologische Beiträge (V). **Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe**, 1876.

SWOFFORD, D. L. **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4**. Sunderland, Massachusetts.: Sinauer Associates, 2003.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–9, 2013.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22,

n. 22, p. 4673–4680, 1994.

TORRENTE-VILARA, G. et al. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). **Ecology of Freshwater Fish**, v. 20, n. 4, p. 588–597, 2011.

ZANATA, A. M.; TOLEDO-PIZA, M. Taxonomic revision of the South American fish genus *Chalceus* Cuvier (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) with the description of three new species. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 140, n. 1, p. 103–135, 2004.

1.7 Material suplementar 1

1.7.1 Tabelas

Tabela S1.1 Vouchers e sítios de coleta para todos os *Leporinus* cf. *friderici* analisados.

Amostras	Espécimes	Sítios de coleta (rio)	Bacia Hidrográfica	Latitude	Longitude	Número dos vouchers
L226	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Mearim	Pindaré ¹	3°39'33.79"S	45°28'2.81"W	CPUFMA 2921
L743	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Amazonas 1	Jamxim ²	7°3'52.0"S	55°26'28.0"W	MZUSP 097513
AECIO18-10	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Amazonas 1	Amazonas ³	3°17'13.9"S	60°1'87"W	M3-34
L258	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Amazonas 2	Amazonas ⁴	2°13'52.70"S	45°19'15.46"W	-
L515	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Amazonas 2	Lago Sampaio ⁵	3°50'9.40"S	59°10'43"W	UFRO - I 1003
L742	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Xingu	13 de maio ⁶	8°43'41"S	55°1'38"W	MZUSP 097129
L491	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Madeira 1	Mequéns ⁷	12°51'28.18"S	62°10'4.41"W	-
L516	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Madeira 1	Guaporé ⁸	12°51'16.17"S	62°54'5.83"W	UFRO - 12222
L073	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Madeira 1	Capivari ⁹	14°42'38.7"S	60°14'56.9"W	LISDEBE 6975
L081	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Madeira 2	Guaporé ¹⁰	15°12'57.62"S	59°24'14.29"W	MZUSP 115358
L142	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Tocantins 1	Araguaia ¹¹	14° 45'36"S	51° 52'26"W	GPEPMA 5477
L143	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Tocantins 1	Araguaia ¹¹	14° 45'36"S	51° 52'26"W	-
L144	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Tocantins 1	Araguaia ¹¹	14° 45'36"S	51° 52'26"W	-
L388	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Tocantins 1	Araguaia ¹²	15°53'42.37"S	52°15'16.46"W	GPEPMA 6115
L390	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Tocantins 1	Araguaia ¹²	15°53'42.37"S	52°15'16.46"W	GPEPMA 6117
L391	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Tocantins 1	Araguaia ¹²	15°53'42.37"S	52°15'16.46"W	GPEPMA 6118
L392	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i>	Tocantins 1	Araguaia ¹²	15°53'42.37"S	52°15'16.46"W	GPEPMA 6119

L393	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Tocantins 1	Araguaia ¹²	Tocantins	15°53'42.37"S	52°15'16.46"W	GEPEMA 6120
L173	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Tocantins 2	Araguaia ¹³	Tocantins	15°53'42.37"S	52°9'44.40"W	MZUSP 115359
L030	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Bandeirantes ¹⁴	Paraguai	14°48'55.3"S	57°06'20.8"W	-
L019	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Bandeirantes ¹⁴	Paraguai	14°48'55.3"S	57°06'20.8"W	-
L027	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Bandeirantes ¹⁴	Paraguai	14°48'55.3"S	57°06'20.8"W	-
L029	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Bandeirantes ¹⁴	Paraguai	14°48'55.3"S	57°06'20.8"W	-
L034	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Sepotuba ¹⁵	Paraguai	14°36'32'8"S	57°44'04.6"W	-
L037	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Sepotuba ¹⁵	Paraguai	14°36'32'8"S	57°44'04.6"W	-
L040	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Sepotuba ¹⁵	Paraguai	14°36'32'8"S	57°44'04.6"W	-
L044	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Sepotuba ¹⁵	Paraguai	14°36'32'8"S	57°44'04.6"W	-
L047	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Sepotuba ¹⁵	Paraguai	14°36'32'8"S	57°44'04.6"W	-
L049	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Sepotuba ¹⁵	Paraguai	14°36'32'8"S	57°44'04.6"W	-
L041	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraguai	Sepotuba ¹⁵	Paraguai	14°36'32'8"S	57°44'04.6"W	MZUSP 113985
L1049	<i>Leporinus cf. friderici</i>	alto Tapajós	Arinos ¹⁶	Tapajós	11°16'51.42"S	57°33'39.38"W	-
L1050	<i>Leporinus cf. friderici</i>	alto Tapajós	Sangue ¹⁷	Tapajós	11°42'22.75"S	58°3'00.11"W	-
L1051	<i>Leporinus cf. friderici</i>	alto Tapajós	Vermelho ¹⁸	Tapajós	10°45'38.9"S	58°21'34.6"W	-
L1052	<i>Leporinus cf. friderici</i>	alto Tapajós	Juruena ¹⁹	Tapajós	9°52'45.4"S	58°14'06"W	-
L739	<i>Leporinus cf. friderici</i>	alto Tapajós	Renato ²⁰	Tapajós	11°4'24.0"S	55°14'35.0"W	MZUSP 099126
L018	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Turvo ²¹	Paraná	20°25'24.0"S	49°15'16.6"W	MZUSP 113983
L271	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²²	Paraná	23°21'38.81"S	53°45'12.30"W	-
L272	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²²	Paraná	23°21'38.81"S	53°45'12.30"W	-
L273	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²²	Paraná	23°21'38.81"S	53°45'12.30"W	-
L274	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²²	Paraná	23°21'38.81"S	53°45'12.30"W	-
L275	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²²	Paraná	23°21'38.81"S	53°45'12.30"W	-
L277	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²²	Paraná	23°21'38.81"S	53°45'12.30"W	-
L278	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²²	Paraná	23°21'38.81"S	53°45'12.30"W	-
L279	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²²	Paraná	23°21'38.81"S	53°45'12.30"W	-
L280	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²²	Paraná	23°21'38.81"S	53°45'12.30"W	-
L281	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²²	Paraná	23°21'38.81"S	53°45'12.30"W	-
L367	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná	Paraná ²³	Paraná	21°08'30.37"S	51°48'43.80"W	-

L374	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná ²³	Paraná	21°08'30.37"S	51°48'43.80"W	-
L400	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná ²⁴	Paraná	23°25'12"S	53°54'23"W	-
L403	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná ²⁴	Paraná	23°25'12"S	53°54'23"W	-
L405	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná ²⁴	Paraná	23°25'12"S	53°54'23"W	-
L428	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Paraná ²⁴	Paraná	23°25'12"S	53°54'23"W	-
L730	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Jacaré-Pepira ²⁵	Paraná	22°14'14.12"S	48°15'49.38"W	-
L823	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Piracicaba ²⁶	Paraná	22°43'10.29"S	47°39'19"W	-
L886	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Mogi-Guaçu ²⁷	Paraná	21°55'38.6"S	47°21'58.4"W	-
L887	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Mogi-Guaçu ²⁷	Paraná	21°55'38.6"S	47°21'58.4"W	-
LBPV44953	<i>Leporinus cf. friderici</i>	Invinhema ²⁸	Paraná	21°S	54°W	-
L678	<i>Leporinus agassizii</i>	Nanay ²⁹	Amazonas	3°49'55"S	73°21'44"W	MUSM 47362
L679	<i>Leporinus agassizii</i>	Nanay ²⁹	Amazonas	3°49'55"S	73°21'44"W	MUSM 47362
L680	<i>Leporinus agassizii</i>	Nanay ²⁹	Amazonas	3°49'55"S	73°21'44"W	MUSM 47362
L681	<i>Leporinus agassizii</i>	Nanay ²⁹	Amazonas	3°49'55"S	73°21'44"W	MUSM 47362
L682	<i>Leporinus agassizii</i>	Nanay ²⁹	Amazonas	3°49'55"S	73°21'44"W	MUSM 47362
L322	<i>Leporinus piau</i>	São Francisco	Urucuia ³⁰	16°09'57.87"S	45°40'21.75"W	-
L323	<i>Leporinus piau</i>	São Francisco	Urucuia ³⁰	16°09'57.87"S	45°40'21.75"W	-
L330	<i>Leporinus piau</i>	São Francisco	Urucuia ³⁰	16°09'57.87"S	45°40'21.75"W	MCP44093
L331	<i>Leporinus piau</i>	São Francisco	Pandeiros ³¹	15°40'18"S	44°38'12.3"W	MCP44837
L332	<i>Leporinus piau</i>	São Francisco	Lagoa da Presa ³²	19°44'36"S	45°27'23"W	MCP44763
L333	<i>Leporinus piau</i>	São Francisco	Lagoa da Presa ³²	19°44'36"S	45°27'23"W	MCP44763
L334	<i>Leporinus piau</i>	São Francisco	Lagoa da Presa ³²	19°44'36"S	45°27'23"W	MCP44763
L335	<i>Leporinus piau</i>	São Francisco	Lagoa da Presa ³²	19°44'36"S	45°27'23"W	MCP44763

CPUFMA, Coleção de Peixes, Universidade Federal do Maranhão

LISDEBE, Laboratório de Ictiologia Sistemática, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos

GPEMA, Grupo de Estudos em Peixes do Médio Araguaia, Campus Universitário do Médio Araguaia, Universidade Federal do Mato Grosso

M3-34, University of Oviedo

MCP, Museu de Ciências e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

MZUSP, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo

MUSM, Museo de História Natural, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

UFRO, Universidade Federal de Rondônia

Tabela S1.2 Número de acesso ao GenBank para todas as sequências nucleotídicas analisadas.

Amostras	Espécies	Números de acesso ao GenBank				
		COI	Citb	Myh6	RAG1	RAG2
L226	<i>Leporinus cf. friderici</i> Mearim	MF664226	MF664289	MF664304	MF664319	MF664334
L743	<i>Leporinus cf. friderici</i> Amazonas 1	MF664227	MF664290	MF664305	MF664320	MF664335
AECI018-10	<i>Leporinus cf. friderici</i> Amazonas 1	AECI018-10 ¹	-	-	-	-
L258	<i>Leporinus cf. friderici</i> Amazonas 2	MF664228	MF664291	MF664306	MF664321	MF664336
L742	<i>Leporinus cf. friderici</i> Xingu	MF664229	MF664292	MF664307	MF664322	MF664337
L491	<i>Leporinus cf. friderici</i> Madeira 1	MF664230	MF664293	MF664308	MF664323	MF664338
L516	<i>Leporinus cf. friderici</i> Madeira 1	MF664231	MF664294	MF664309	MF664324	MF664339
L073	<i>Leporinus cf. friderici</i> Madeira 1	MF664232	-	-	-	-
L081	<i>Leporinus cf. friderici</i> Madeira 2	MF664233	MF664295	MF664310	MF664325	MF664340
L515	<i>Leporinus cf. friderici</i> Madeira 2	MF664234	MF664296	MF664311	MF664326	MF664341
L142	<i>Leporinus cf. friderici</i> Tocantins 1	MF664235	MF664297	MF664312	MF664327	MF664342
L143	<i>Leporinus cf. friderici</i> Tocantins 1	MF664236	-	-	-	-
L144	<i>Leporinus cf. friderici</i> Tocantins 1	MF664237	-	-	-	-
L388	<i>Leporinus cf. friderici</i> Tocantins 1	MF664238	-	-	-	-
L390	<i>Leporinus cf. friderici</i> Tocantins 1	MF664239	-	-	-	-
L391	<i>Leporinus cf. friderici</i> Tocantins 1	MF664240	-	-	-	-
L392	<i>Leporinus cf. friderici</i> Tocantins 1	MF664241	-	-	-	-

L393	<i>Leporinus cf. friderici</i> Tocantins 1	MF664242	-	-	-	-
L173	<i>Leporinus cf. friderici</i> Tocantins 2	MF664243	MF664298	MF664313	MF664328	MF664343
L030	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	MF664244	-	-	-	-
L034	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	MF664245	-	-	-	-
L037	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	MF664246	-	-	-	-
L040	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	MF664247	-	-	-	-
L044	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	MF664248	-	-	-	-
L047	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	MF664249	-	-	-	-
L049	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	MF664250	-	-	-	-
L041	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	KF568983 ²	KF569026 ²	KF569155 ²	KF569069 ²	KF569112 ²
L019	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	MF664251	-	-	-	-
L027	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	MF664252	-	-	-	-
L029	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraguai	MF664253	-	-	-	-
L1049	<i>Leporinus cf. friderici</i> alto Tapajós	MF664254	-	-	-	-
L1050	<i>Leporinus cf. friderici</i> alto Tapajós	MF664255	-	-	-	-
L1051	<i>Leporinus cf. friderici</i> alto Tapajós	MF664256	-	-	-	-
L1052	<i>Leporinus cf. friderici</i> alto Tapajós	MF664257	-	-	-	-
L739	<i>Leporinus cf. friderici</i> alto Tapajós	MF664258	MF664299	MF664314	MF664329	MF664344
L018	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	KF568982 ²	KF569025 ²	KF569154 ²	KF569154 ²	KF569154 ²
LBPV-44953	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	JN988988 ²	-	-	-	-
L271	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664259	-	-	-	-
L272	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664260	-	-	-	-
L273	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664261	-	-	-	-
L274	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664262	-	-	-	-
L275	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664263	-	-	-	-
L277	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664264	-	-	-	-
L278	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664265	-	-	-	-
L279	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664266	-	-	-	-
L280	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664267	-	-	-	-

L281	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664268	-	-	-	-
L367	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664269	-	-	-	-
L374	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664270	-	-	-	-
L400	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664271	-	-	-	-
L403	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664272	-	-	-	-
L405	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664273	-	-	-	-
L428	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664274	-	-	-	-
L730	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664275	-	-	-	-
L823	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664276	-	-	-	-
L886	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664277	-	-	-	-
L887	<i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	MF664278	-	-	-	-
L678	<i>Leporinus agassizii</i>	MF664279	-	-	-	-
L679	<i>Leporinus agassizii</i>	MF664280	MF664300	MF664315	MF664330	MF664345
L680	<i>Leporinus agassizii</i>	MF664281	-	-	-	-
L681	<i>Leporinus agassizii</i>	MF664282	-	-	-	-
L682	<i>Leporinus agassizii</i>	MF664283	-	-	-	-
L910	<i>Leporinus boehlkei</i>	MF664284	MF664301	MF664316	MF664331	MF664346
L376	<i>Leporinus piau</i> Jaguaribe	MF664285	MF664302	MF664317	MF664332	MF664347
L322	<i>Leporinus piau</i> São Francisco	KF568990 ²	KF569033 ²	KF569162 ²	KF569076 ²	KF569119 ²
L323	<i>Leporinus piau</i> São Francisco	MF664286	MF664303	MF664318	MF664333	MF664348
L330	<i>Leporinus piau</i> São Francisco	HM405143 ²	-	-	-	-
L331	<i>Leporinus piau</i> São Francisco	HM405144 ²	-	-	-	-
L332	<i>Leporinus piau</i> São Francisco	HM405145 ²	-	-	-	-
L333	<i>Leporinus piau</i> São Francisco	HM405146 ²	-	-	-	-
L334	<i>Leporinus piau</i> São Francisco	MF664287	-	-	-	-
L335	<i>Leporinus piau</i> São Francisco	MF664288	-	-	-	-
L141	<i>Leporinus desmotes</i>	KF568979 ²	KF569022 ²	KF569151 ²	KF569065 ²	KF569108 ²
L496	<i>Leporinus fasciatus</i>	KF568981 ²	KF569024 ²	KF569153 ²	KF569067 ²	KF569110 ²
L088	<i>Leporinus lacustris</i> Paraguai	KF568985 ²	KF569028 ²	KF569157 ²	KF569071 ²	KF569114 ²

L213	<i>Leporinus lacustris</i> Paraná	KF568986 ²	KF569029 ²	KF569158 ²	KF569072 ²	KF569115 ²
L021	<i>Leporinus octomaculatus</i>	KF568988 ²	KF569031 ²	KF569160 ²	KF569074 ²	KF569117 ²
L527	<i>Leporinus cf. parae</i>	KF568999 ²	KF569042 ²	KF569171 ²	KF569085 ²	KF569128 ²
L631	<i>Leporinus cf. parae</i>	MF677847	MF677848	MF677849	MF677850	MF677851
L356	<i>Leporinus taeniatus</i>	KF568996 ²	KF569039 ²	KF569168 ²	KF569082 ²	KF569125 ²
L185	<i>Leporinus venerei</i>	KF569001 ²	KF569044 ²	KF569173 ²	KF569087 ²	KF569130 ²
L479	<i>Hypomasticus pachycheilus</i>	KF568973 ²	KF569016 ²	KF569145 ²	KF569059 ²	KF569102 ²
ANSP 189264	<i>Leporinus friderici</i>	KX086747 ²	KX086812 ²	KX086872 ²	KX086958 ²	KX086985 ²

¹sequência proveniente do banco de dados BOLDSYSTEMS

²sequência proveniente do banco do GenBank

COI, Citocromo Oxidase subunidade 1

Citb, Citocromo b

Myh6, cadeia pesada 6 da miosina, isoforma alfa do músculo cardíaco

RAG1, Gene Ativador da Recombinação 1

RAG2, Gene Ativador da Recombinação 2

Tabela S1.3 Valores de distância par a par entre e dentro (em negrito) das MOTUs do clado *Leporinus* cf. *friderici sensu stricto* usando o modelo K2p. Valores estão em porcentagem.

	<i>Leporinus</i> <i>agassizii</i>	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i> Amazonas 1	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i> Madeira 1	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i> Paraná	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i> Paraguai	<i>Leporinus</i> <i>piau</i> São Francisco	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i> Alto Tapajós	<i>Leporinus</i> cf. <i>friderici</i> Tocantins 1
<i>Leporinus agassizii</i>	0,5							
<i>L. cf. friderici</i> Amazonas 1	1,5	0,2						
<i>L. cf. friderici</i> Madeira 1	1,6	1,0	0,0					
<i>L. cf. friderici</i> Paraná	1,5	0,9	1,1	0,2				
<i>L. cf. friderici</i> Paraguai	1,8	1,3	1,4	0,5	0,2			
<i>L. piau</i> São Francisco	1,9	1,4	1,1	1,1	1,4	0,0		
<i>L. cf. friderici</i> Alto Tapajós	2,4	1,7	2,1	2,0	2,4	2,1	0,1	
<i>L. cf. friderici</i> Tocantins 1	2,0	1,4	1,1	1,1	1,4	0,4	2,2	0,4
<i>Leporinus friderici</i> (Suriname)	5,0	4,9	5,0	4,8	4,5	5,4	5,2	5,3

1.7.2 Figuras

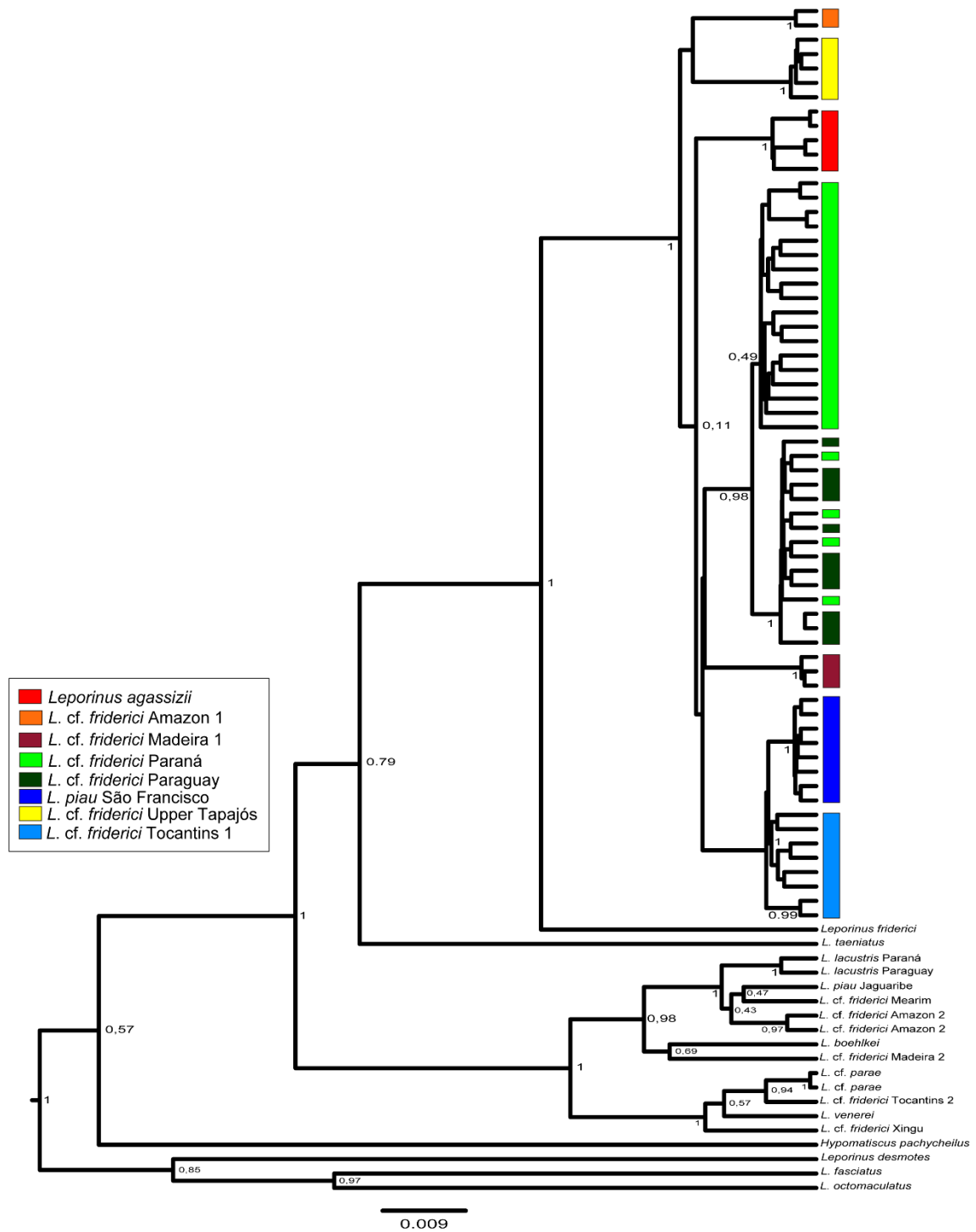


Figura S1.1 Árvore Bayesiana para o gene citocromo oxidase subunidade 1. Os valores nos nós representam a probabilidade posterior.

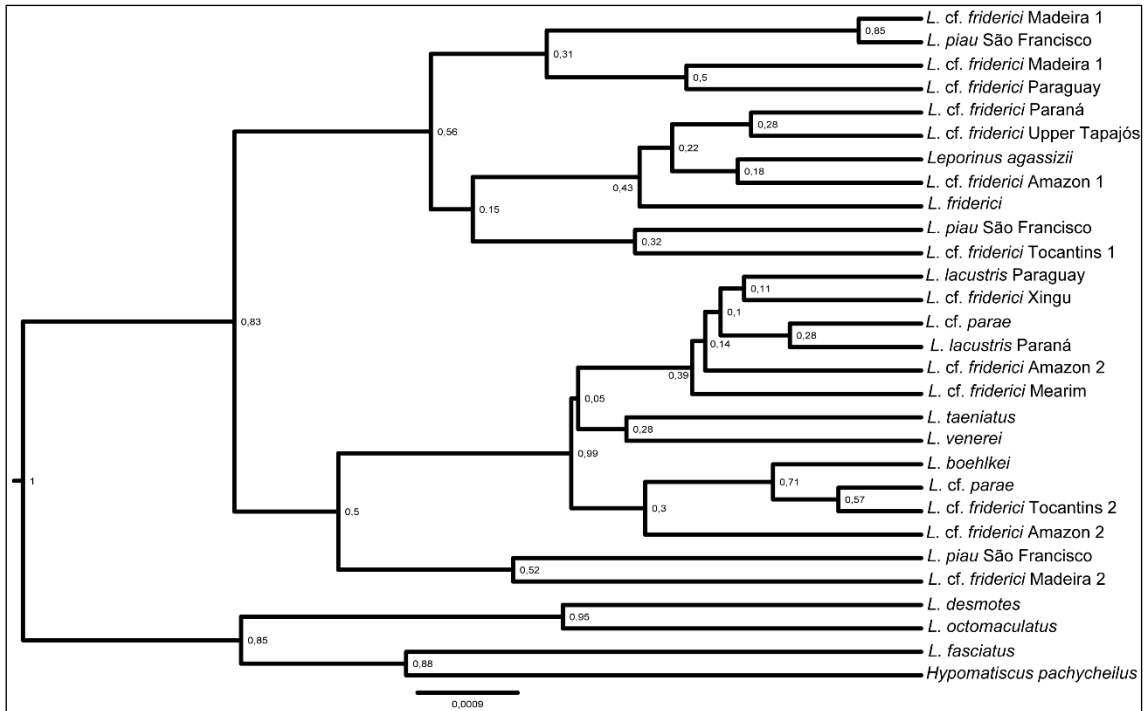


Figura S1.2 Árvore Bayesiana para o gene citocromo b. Os valores nos nós representam a probabilidade posterior.

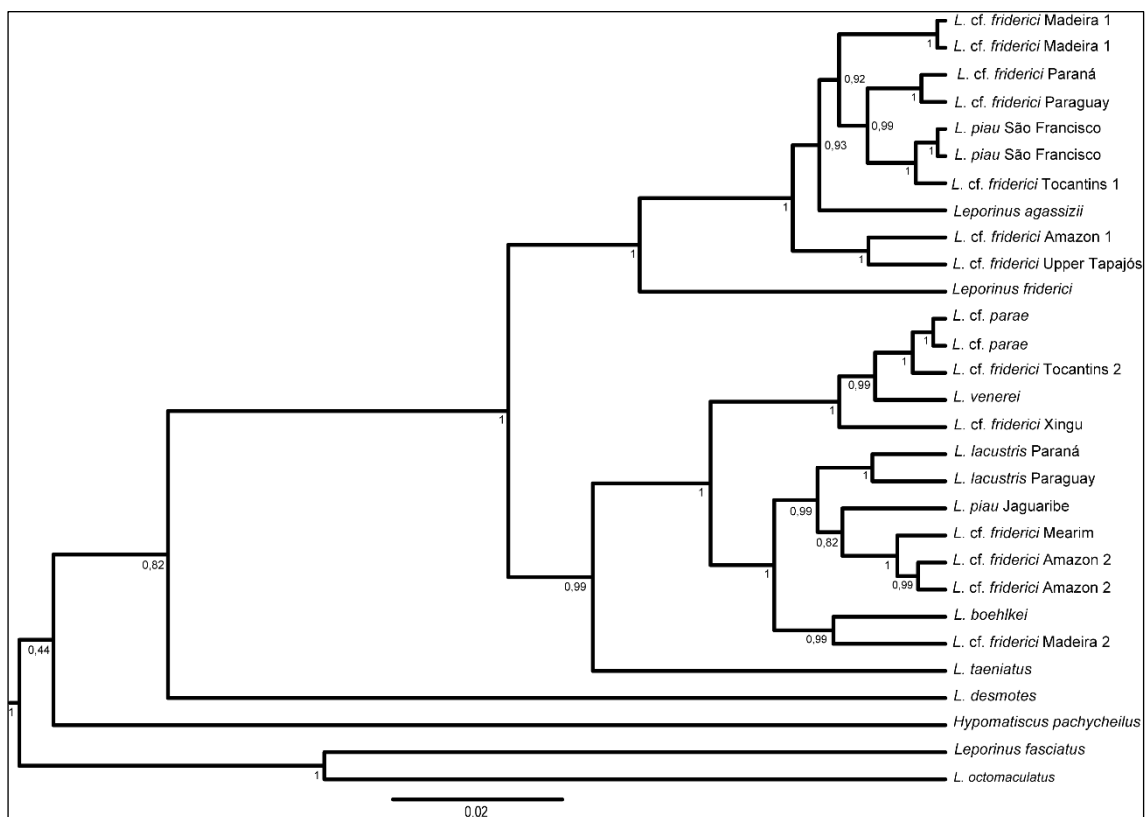


Figura S1.3 Árvore Bayesiana para o gene da cadeia pesada 6 da miosina, isoforma alfa do músculo cardíaco. Os valores nos nós representam a probabilidade posterior.

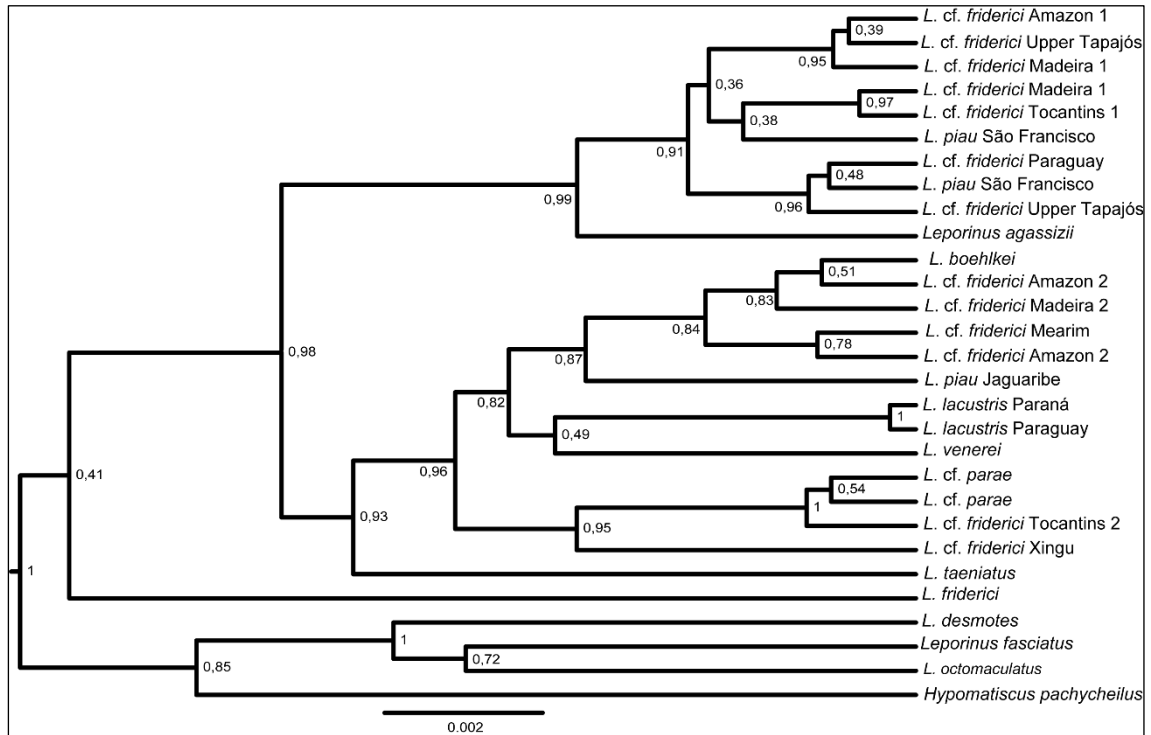


Figura S1.4 Árvore Bayesiana para o gene *Activador da Recombinação 1*. Os valores nos nós representam a probabilidade posterior.

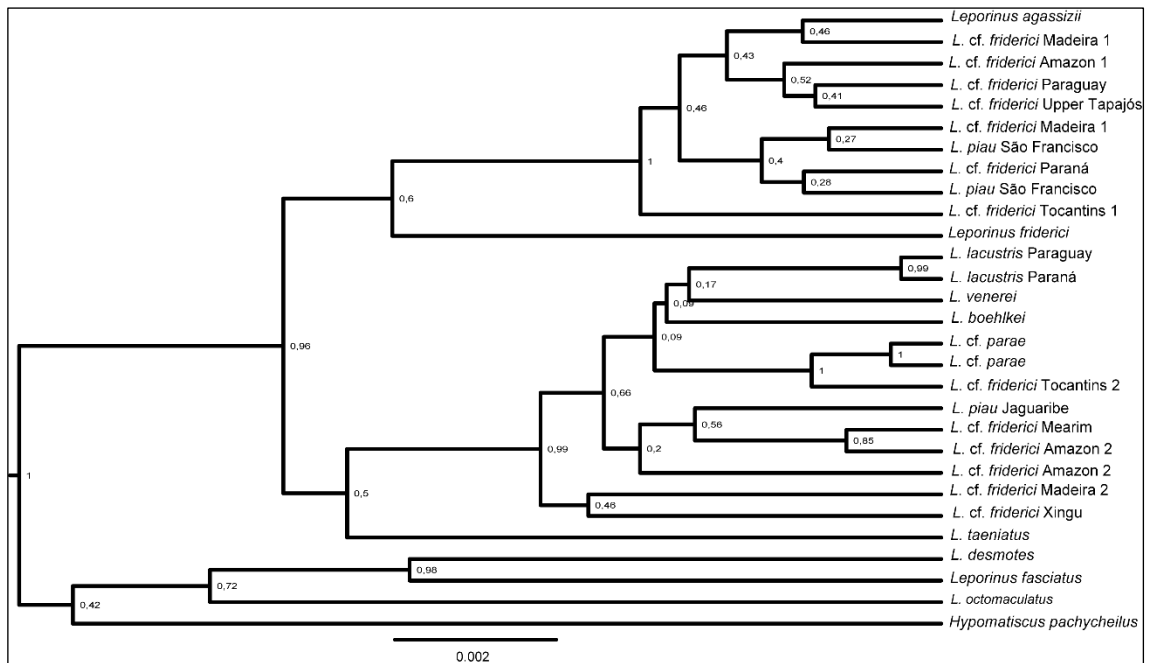


Figura S1.5 Árvore Bayesiana para o gene *Activador da Recombinação 2*. Os valores nos nós representam a probabilidade posterior.

Capítulo 2

Diversidade genética e estrutura populacional em
Leporinus cf. friderici Paraná e *Megaleporinus*
obtusidens na bacia do alto rio Paraná

ABSTRACT

The species *Leporinus cf. friderici* Paraná and *Megaleporinus obtusidens* belong to the family Anostomidae and are recognized as important resources for subsistence, artisanal and recreational fishing. These migratory fish show different Molecular Operational Taxonomy Unit (MOTU) in the Upper Paraná basin. The Upper Paraná basin is highly impacted by the presence of many hydroelectric dams, which represent a potential risk to the maintenance of genetic variability and population viability since they can cause interruptions in migratory routes and promote genetic structuring in populations of occurrence in that area. In this study we aimed to evaluate the genetic diversity and population structuring of *L. cf. friderici* Paraná and *M. obtusidens* from the main sub-basins of Upper Paraná drainage and to infer changes in effective population size and possible events that have contributed to the observed current scenario. Control region (D-loop) sequences of mitochondrial DNA and microsatellite loci were analyzed. Mitochondrial data indicated the historical existence of a single genetic population for both species. Contrarily, the microsatellite results point to the existence of three genetic clusters within each species, suggesting a more recent diversification. These clusters were not related to the geographic area but are heterogeneously distributed throughout the different sub-basins analyzed. The mitochondrial results revealed a high genetic diversity for both species. The observed values of genetic diversity for the microsatellite loci, however, are smaller than those found for other migratory species, also from the Upper Paraná river basin. With regard to demographic changes, both species have experienced population expansion in the last fifty thousand years, probably related to climatic changes during the Pleistocene. Bottleneck analyzes do not indicate a recent population reduction in any of the species. The data generated in the present study is extremely important since they characterize the population genetic structure of *L. cf. friderici* Paraná and *M. obtusidens* in the Upper Paraná river basin and contribute with valuable information for the development of future plans or management actions aimed at the conservation of these species in the hydrographic systems where they occur.

Key words: Migratory fishes, D-loop, microsatellites, population genetics

RESUMO

As espécies *Leporinus cf. friderici* Paraná e *Megaleporinus obtusidens*, pertencentes à família Anostomidae, são reconhecidas por serem recursos importantes para a pesca de subsistência, artesanal e esportiva. Estes são peixes migradores que possuem uma Unidade Taxonômica Operacional Molecular diferenciada (MOTU) na bacia do alto rio Paraná. A bacia do alto rio Paraná é altamente impactada pela presença de muitas usinas hidrelétricas, as quais representam um risco potencial à manutenção da variabilidade genética e viabilidade populacional, uma vez que podem ocasionar interrupções nas rotas migratórias e promover estruturação nas populações que lá ocorrem. Nesse trabalho nós realizamos uma avaliação da diversidade genética e estrutura populacional de *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens* das principais sub-bacias do alto rio Paraná e inferimos sobre mudanças no tamanho efetivo populacional e possíveis eventos que contribuíram para o atual cenário observado. Foram analisadas sequências da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) e locos de microssatélites. Os dados mitocondriais indicaram a existência histórica de uma única população genética em ambas as espécies. Por outro lado, os dados de microssatélites apontam para a existência de três *clusters* genéticos dentro de cada espécie, sugerindo uma diversificação mais recente. Esses *clusters* não tiveram relação com a área geográfica, estando os mesmos heterogeneamente distribuídos ao longo das diferentes sub-bacias analisadas. Os resultados mitocondriais revelaram uma elevada diversidade genética para ambas as espécies. Os valores de diversidade genética observados para os locos de microssatélites, no entanto, são menores que aqueles encontrados para outras espécies migradoras, também da bacia do alto rio Paraná. Com relação às mudanças demográficas, as duas espécies passaram por expansão populacional nos últimos cinquenta mil anos, provavelmente relacionada as alterações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno. As análises de *bottleneck* não indicam uma redução populacional recente em nenhuma das espécies. Os dados levantados aqui são extremamente importantes, uma vez que caracterizam a estrutura genético-populacional de *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens* na bacia do alto rio Paraná e contribuem com informações valiosas para o desenvolvimento de futuros planos ou ações de manejo que visem a conservação dessas espécies nos sistemas hidrográficos onde ocorrem.

Palavras chaves: Peixes migradores, D-loop, microssatélites, genética populacional

2.1 Introdução

2.1.1 Bacia do alto rio Paraná

A bacia do rio Paraná, localizada na região centro-sul da América do Sul, é considerada a segunda maior bacia dessa região, drenando uma área de quatro milhões de metros quadrados que abrange cinco países: Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia (AGOSTINHO; VAZZOLER; THOMAZ, 1995; SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTI, 2001). Dentro da bacia do rio Paraná, separada originalmente pela antiga cachoeira de Sete Quedas ou Salto Guaíra, que desde 1982 foi submersa pela Usina Hidrelétrica (UHE) de Itaipu (JÚLIO JÚNIOR et al., 2009), está localizada a bacia do alto rio Paraná (Figura 2.1). Essa bacia representa um terço da bacia do rio Paraná, apresentando 750Km de extensão desde Itaipu até a confluência dos rios Grande e Paranaíba (DA SILVA et al., 2015).

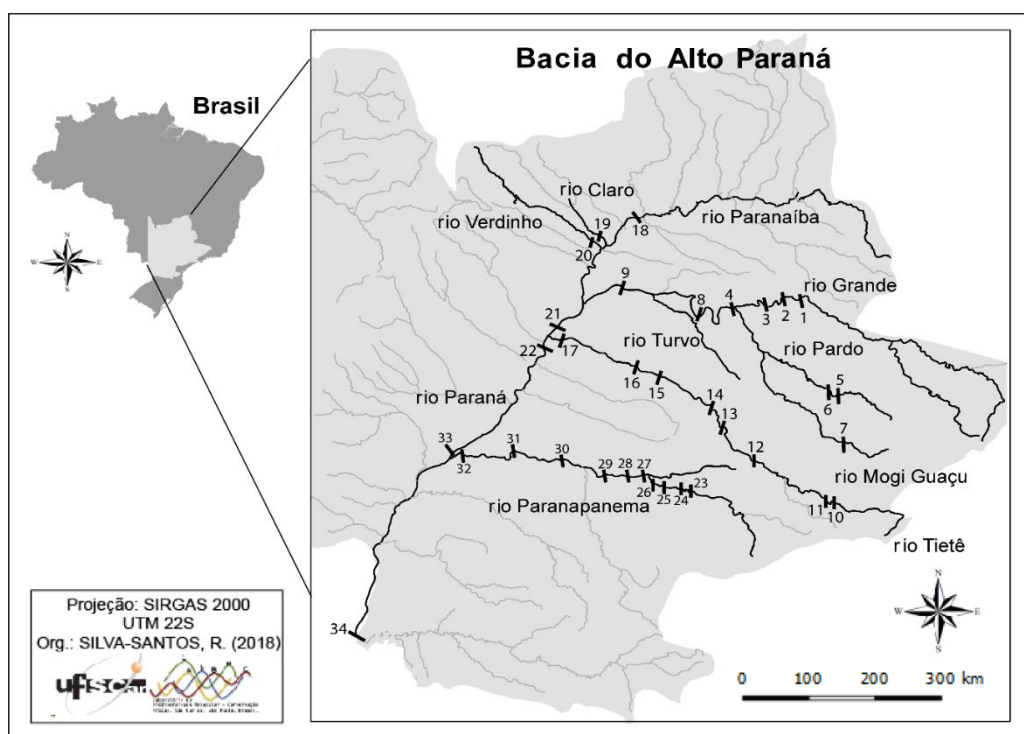


Figura 2.1 Localização da bacia do alto rio Paraná dentro do contexto brasileiro. No detalhe, as sub-bacias dos rios Paranaíba, Verdinho, Claro, Grande, Pardo, Mogi Guaçu, Turvo, Tietê, Paraná e Paranapanema. As barras pretas representam algumas das principais Usinas Hidrelétricas (UHEs) implementadas na bacia do alto rio Paraná, região de coleta do presente trabalho. 1- UHE Jaguara, 2- UHE Igarapava, 3- UHE Volta Grande, 4- UHE Porto Colômbia, 5- UHE Euclides da Cunha, 6- UHE Armando Salles (Limoeiro), 7- Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Mogi Guaçu, 8- UHE Marimbondo, 9- UHE Água Vermelha, 10- UHE Edgard Souza, 11- UHE

Pirapora do Bom Jesus, 12- UHE Barra Bonita, 13- UHE Álvaro de Souza Lima (Bariri), 14- UHE Ibitinga, 15- UHE Mário Lopes Barreto (Promissão), 16- UHE Nova Avanhandava, 17- UHE Pereira Barreto (Três irmãos), 18- UHE de São Simão, 19- UHE Foz do rio Claro, 20- UHE Salto do rio Verde, 21- UHE Ilha Solteira, 22- UHE Jupia, 23- UHE Jurumirim, 24- UHE Piraju, 25- UHE Chavantes, 26- UHE Ourinhos, 27- UHE de Salto Grande, 28- UHE Canoas II, 29- UHE Canoas I, 30- UHE Capivara, 31- UHE Taquaraçu, 32- UHE Rosana, 33- UHE Porto Primavera, 34- UHE de Itaipu.

A bacia do alto rio Paraná é umas das principais fontes de energia hidrelétrica do Brasil (AGOSTINHO et al., 2002), possuindo ao longo de sua extensão aproximadamente 145 UHEs de grande porte (AGOSTINHO; PELICICE; GOMES, 2008). A primeira usina foi construída em 1901 e está localizada no rio Tietê (AGOSTINHO et al., 2003). Segundo Agostinho et al., (2003), 80% dessas UHEs foram construídas a partir de 1960 (AGOSTINHO; VAZZOLER; THOMAZ, 1995).

Além da importância econômica, relacionada aos aspectos de geração de energia hidrelétrica, a bacia do alto rio Paraná também se destaca pelo elevado endemismo de sua ictiofauna e aspectos biogeográficos interessantes. Essa região é conhecida por apresentar características ecológicas, história evolutiva e composição de espécies distintas do restante da bacia (RINGUELET, 1975; ABELL, 2008). Segundo Langeani et al. (2007), o alto rio Paraná inclui pelo menos 310 espécies, distribuídas em 38 famílias e 10 ordens diferentes. Dentre essas espécies, dezenove são migradoras de longa distância, incluindo *Leporinus cf. friderici* Paraná (MOTU de *L. cf. friderici* pertencente à bacia do alto rio Paraná) e *Megaleporinus obtusidens*, e apresentam importância ecológica e comercial considerável (AGOSTINHO et al., 2003).

2.1.2 Espécies

Os gêneros *Leporinus* AGASSIZ, 1829 e *Megaleporinus* (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI, 2017) compreendem espécies da família Anostomidae, as quais estão amplamente distribuídas nos rios da América do Sul, apesar de não existirem registros para as drenagens transandinas do Pacífico (GARAVELLO; BRITSKI, 2003). Os peixes dessa família também apresentam uma ampla variação de tamanho, que varia de pequeno (10cm) a grande porte (80cm). Espécies de maior porte, como as pertencentes

aos gêneros *Leporinus*, *Megaleporinus* e *Schizodon*, apresentam grande importância para a pesca esportiva, artesanal e de subsistência, além de possuírem relevante potencial para a piscicultura (GODOY, 1975; GARAVELLO; BRITSKI, 2003; BRITTO; SIROL; VIANNA, 2003).

Leporinus friderici BLOCK, 1794, também conhecida como piava ou piauí três pintas, possui uma coloração prata, com três manchas escuras nos flancos, nadadeiras ligeiramente douradas e nadadeira caudal escura. Essa espécie pode alcançar 40 cm de comprimento e 2 kg de peso (Figura 2.2A) e sendo comumente encontrada nos rios do Suriname, da Guiana Francesa e do Brasil, onde ocorre nas bacias, Amazônica, do Nordeste e do Paraná (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007; GRAÇA; PAVANELLI, 2007). Alguns trabalhos, no entanto, têm questionado essa ampla distribuição, apontando para a existência de diferenças morfológicas e/ou moleculares significativas dentro desse grupo (GÉRY; MAHNERT; DLOUHY, 1987; RENNO, BERREBI, BOUJARD, 1990; RENNO et al., 1991; GARAVELLO, REIS, 1992; SIDLAUSKAS; VARI, 2012), as quais sugerem a existência de diversidade oculta. O recente trabalho realizado por Silva-Santos et al. (2018) evidenciou a existência de oito Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) de *Leporinus cf. friderici*, não coespecíficas a *L. friderici*. Nesse estudo, a MOTU pertencente à bacia do alto rio Paraná foi denominada *L. cf. friderici* Paraná.

A espécie *Megaleporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837), popularmente conhecida como piapara ou piauí verdadeiro (BRITSKI; BIRINDELLI; GARAVELLO, 2012), possui um corpo escuro no dorso e claro no ventre, além de apresentar lateralmente manchas e faixas escuras pouco evidentes (Figura 2.2B) e nadadeiras amareladas (BRITTO; SIROL; VIANNA, 2003). Seu tamanho varia de acordo com o hábitat e já foram relatados indivíduos com 40 a 80 cm de comprimento e média de peso corpóreo de 3 kg, no rio Paraná (TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008). A distribuição dessa espécie é registrada para os rios da bacia do Prata (Paraná, Paraguai e Uruguai) e São Francisco (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007). Entretanto, assim como para *L. cf. friderici*, a ampla distribuição de *M. obtusidens* tem sido questionada em estudos genético-moleculares. Um trabalho recentemente publicado avaliou a existência de MOTUs para espécies do gênero *Megaleporinus*, e identificou três distintas MOTUs dentro de *M. obtusidens*: *M. obtusidens* bacia do alto rio Paraná, *M. cf. obtusidens* São Francisco e *M. cf. obtusidens* Paraguai (RAMIREZ et al., 2017).



Figura 2.2 **A)** Indivíduo de *Leporinus cf. friderici* Paraná coletado no rio Mogi Guaçu (A). Escala: 10cm. **B)** Indivíduo de *Megaleporinus obtusidens* coletado na calha principal do rio Paraná (alto rio paraná). Escala: 14cm.

Assim como as demais espécies da família Anostomidae, *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens* possuem uma alta plasticidade alimentar. Se alimentam prioritariamente de vegetais superiores (raízes, sementes e frutos) além de insetos, moluscos, restos de peixes e demais detritus (AGOSTINHO et al., 2003; TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008). Essa plasticidade alimentar posiciona tais espécies nos elos intermediários da cadeia trófica, atribuindo a importante função de manutenção do equilíbrio do ciclo biológico dos ambientes em que ocorrem (ARAYA; AGOSTINHO; BECHARA, 2005). Além disso, devido ao seu comportamento alimentar generalista, essas espécies possuem a capacidade de colonizar diferentes hábitats. Entretanto, segundo Orsi (2005), a estreita relação entre seu alimento e as regiões marginais dos ambientes aquáticos, as quais vêm sendo drasticamente reduzidas, pode por em risco a viabilidade e manutenção dessas espécies nestas regiões.

Leporinus cf. friderici Paraná e *M. obtusidens* são espécies que necessitam realizar migrações para completar seu ciclo de vida. Elas dependem diretamente de uma migração ascendente para desenvolver suas gnadas e desovarem (AGOSTINHO et al., 2003). Para além da reprodução, a migração também pode se dar por motivos diversos relacionados

à alimentação, fuga de condições ambientais adversas e temperatura, por exemplo (AGOSTINHO et al., 2003). Espécies migratórias apresentam papel relevante para o equilíbrio e funcionamento dos ecossistemas, uma vez que promovem o transporte de matéria e energia, modificando a composição da rede trófica e de atributos físicos e químicos da água (FLECKER et al., 2010).

Em geral, as migrações reprodutivas de *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens* têm início no mês de setembro e duram até os meses de janeiro e fevereiro (AGOSTINHO et al., 2003), período mais chuvoso do ano em algumas regiões. Essas espécies, realizam a migração ascendente reprodutiva, caracterizada pela subida até as regiões mais altas dos rios e tributários, com a finalidade de desova total (sem cuidado parental). Por outro lado, uma migração descendente trófica é realizada, caracterizada pela descida até o canal principal para fins de alimentação (GODOY, 1975). Devido a existência de inúmeros barramentos ao longo do canal principal do rio Paraná e de seus principais tributários, os movimentos migratórios dessas espécies, na bacia do alto rio Paraná, parecem estar mais restritos. Um estudo realizado por Martins et al. (2003) relatou que, segundo pescadores locais, está havendo uma diminuição na quantidade de peixes da espécie *M. obtusidens* capturados nessa bacia. Os autores relacionam esta diminuição dos estoques pesqueiros com as alterações ambientais provocadas pela instalação desses barramentos.

2.1.3 Impactos dos barramentos

A ocorrência de barramentos nos ambientes aquáticos, produz diversos impactos ecológicos e de natureza biológica, amplamente discutidos na literatura e citados como os grandes responsáveis pelo desaparecimento de espécies de peixes migradores na bacia do alto rio Paraná (AGOSTINHO et al., 2002, 2007; HOEINGHAUS et al., 2009). A construção de barragens e a formação de reservatórios levam a mudanças em características físicas, químicas e biológicas do rio, modificando a intensidade, duração e época das cheias, reduzindo os nutrientes disponíveis e as áreas temporariamente alagáveis (ASHIKAGA, 2008). Além de alterar o fluxo de água e de sedimentos, ambientes lóticos (água corrente) passam a ser lênticos (água parada). Outras consequências são a redução da vegetação ciliar, importante fonte de alimento e abrigo para formas jovens de peixes; e o desaparecimento das lagoas marginais, fundamentais

para a eclosão de ovos e para a fase juvenil de muitas espécies (AGOSTINHO et al., 2007; AGOSTINHO; ASHIKAGA, 2008; PELICICE; GOMES, 2008;).

No que diz respeito aos impactos ocasionados às espécies migradoras, a presença de barragens interrompe rotas migratórias e elimina obstáculos naturais importantes para essas espécies (AGOSTINHO; GOMES, 2005). O bloqueio de rotas migratórias e o isolamento de populações de peixes nativos reduz tamanho populacional e pode levar a uma perda da variabilidade genética devido à depressão endogâmica (PAIVA; KALAPOTHAKIS, 2008) e à ação da deriva genética (ALLENDORF; LUIKART, 2007).

No Brasil, algumas medidas têm sido propostas como formas de minimizar a interferência das barragens na reprodução dos peixes e amenizar a ameaça de extinção que muitas espécies migradoras têm sofrido (AGOSTINHO; GOMES, 2005). No estado de São Paulo, as Leis nº 2250/1927 e nº 9.798/1997 tratam da obrigatoriedade da construção de escadas para peixes em barragens edificadas em seus cursos de água. Escadas de peixes são as medidas mitigatórias mais utilizadas no alto rio Paraná (AGOSTINHO et al., 2003), local onde também foi construída a primeira escada de peixe do Brasil (no rio Pardo em 1911). Entretanto, diversos estudos questionam a eficiência e a seletividade desses mecanismos, pois algumas espécies não os utilizam. Além disso, tal estratégia tem sido considerada como uma armadilha ecológica em algumas hidrelétricas, pois, apesar dos reprodutores conseguirem subir a montante para realizarem a desova, a prole não consegue fazer o movimento contrário, ocasionando uma redução de estoques de peixes a jusante (AGOSTINHO; PELICICE; GOMES, 2008). Para Rodríguez et al. (2006) esses mecanismos, para serem eficientes, precisam ser reconhecidos prontamente pelos peixes e possuir características apropriadas, como a velocidade da água, turbulência, temperatura, turbidez, ao longo de sua extensão que permitam a ascensão dos animais.

Outra medida, impulsionada pelo Decreto-Lei nº 221/1967, portaria nº 46/1971 da antiga SUDEPE (Superintendência para o Desenvolvimento da Pesca) e pela Lei SP Lei nº 11.165/2002, que visa mitigar os impactos provocados pelas usinas hidrelétricas, foi a implantação de estações de piscicultura e de programas de repovoamento por parte dos empreendimentos (ALZUGUIR, 1994; MATSUMOTO et al., 2009). Também conhecido por estocagem, o repovoamento constitui-se na soltura deliberada de peixes

provenientes de outros sistemas naturais ou de cultivo, em um determinado corpo d'água (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007).

Quando o repovoamento é feito com a finalidade de suplementação, visa-se aumentar a população e a variabilidade genética de uma determinada espécie (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007). Entretanto, para que essa ação seja efetiva é necessário entender o comportamento das espécies, conhecer a estrutura e a diversidade genética das populações que se pretende repovoar e as informações demográficas, para que os indivíduos manejados sofram o menor impacto possível (OLIVEIRA, 2012; RAMOS et al., 2012; FERREIRA et al., 2017).

Quando o repovoamento é realizado de maneira não controlada existe a possibilidade de redução da variabilidade genética das populações que se pretende remanejar, por conta da baixa variabilidade dos alevinos (AGOSTINHO et al., 2003; TANIGUCHI, 2003). Além de provocar uma homogeneização de populações previamente diferenciadas, que possuem histórias de isolamento (STEPIEN, 2007) e uma perturbação na adaptação local (MEHNER, 2009), pois os alevinos destinados à reintrodução não refletem o máximo possível da composição genética da espécie no local manejado (FONSECA, 2017).

Tanto *L. cf. friderici* quanto *M. obtusidens* têm sido utilizadas em programas de manejo pesqueiro que promovem a soltura de indivíduos provenientes de estações de pisciculturas (BRITTO; SIROL; VIANNA, 2003). Entretanto, análises moleculares que avaliam a estrutura genética das populações restringem-se a um estudo realizado por Martins et al. (2003) em *Leporinus friderici* usando dados de DNA mitocondrial e outro em *M. obtusidens* somente na sub-bacia do rio Paranapanema (RAMOS et al., 2012). Desta forma, estudos que considerem uma ampla amostragem na bacia do alto rio Paraná, afim de se obter dados que possibilitariam uma seleção cuidadosa de estoques silvestres, com base em critérios genéticos, são recomendados. Isso garantiria um maior potencial de sucesso dos programas de recuperação e manutenção dessas espécies em seu ambiente natural.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

No tocante aos estudos populacionais em peixes, os marcadores moleculares mais amplamente utilizados têm sido o DNA mitocondrial (região D-loop) e os microssatélites (AGNÈSE et al., 1997; AVISE, 1994). Altos níveis de polimorfismo e reprodutibilidade elevada são características que fazem desses marcadores uma excelente escolha para se reconstruir histórias populacionais mais detalhadas (OLIVEIRA et al., 2006; POWELL; MACHRAY; PROVEN, 1996). Por meio deles é possível identificar populações geneticamente diferenciadas, quantificar a variação genética existente entre e dentro das mesmas e identificar aspectos demográficos e de tamanho efetivo populacional. O conhecimento dessas informações são cruciais para se definir populações e áreas prioritárias em programas de manejo e conservação.

Com base no exposto acima, o objetivo geral é apresentar uma avaliação da variabilidade genética, da estrutura populacional e dos aspectos demográficos históricos das espécies migradoras *Leporinus cf. friderici* Paraná e *Megaleporinus obtusidens* na bacia do alto rio Paraná.

2.2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral de trabalho, alguns objetivos específicos foram estabelecidos. Considerando a ferramenta molecular a ser utilizada e sua aplicação. Desta forma, analisamos sequências da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) e de microssatélites, para acessar informações históricas e recentes, respectivamente, com base no estabelecimento dos seguintes objetivos específicos:

a. Estimar a diversidade genética histórica e recente de *Leporinus cf. friderici* Paraná e *Megaleporinus obtusidens* dentro de diferentes sub-bacias na bacia do alto rio Paraná;

b. Investigar a estruturação populacional histórica e recente dentro da bacia do alto rio Paraná para as espécies *Leporinus cf. friderici* Paraná e *Megaleporinus obtusidens*;

c. Investigar a ocorrência de eventos demográficos históricos e recentes nas espécies *Leporinus cf. friderici* Paraná e *Megaleporinus obtusidens*.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Declarações éticas

As amostras biológicas foram obtidas sob as permissões CMBIO/MMA N° 51607 e CEUA n° 3893250615, seguindo todas as recomendações legais e em acórdância com os protocolos aprovados pelo SISBIO-ICMBio (Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade, Instituto Chico Mendes para Biodiversidade e Conservação, Ministério do Meio Ambiente, Brasil e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil).

2.3.2 Amostragem dos dados biológicos

Foram coletados 120 indivíduos adultos de *Leporinus cf. friderici* Paraná e 121 indivíduos de *Megaleporinus obtusidens* provenientes de diferentes pontos nos principais afluentes do alto rio Paraná, amostrados em diferentes épocas do ano. Os detalhes sobre os pontos de coleta para cada uma das espécies estudadas são fornecidos nas figuras 2.3 e 2.4, respectivamente.

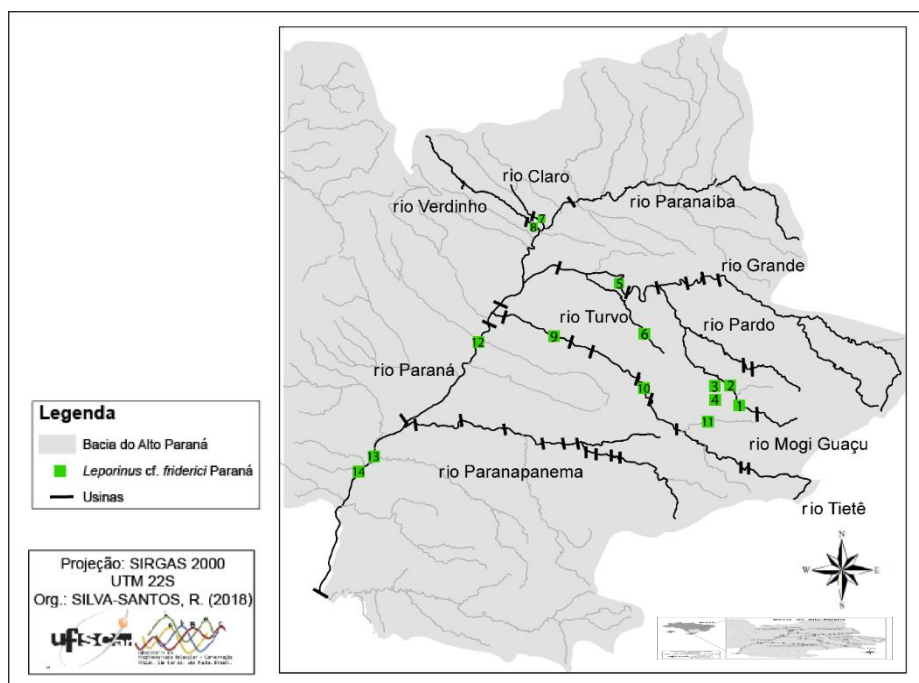


Figura 2.3 Mapa da bacia do alto rio Paraná indicando os pontos de coleta das amostras de *Leporinus cf. friderici* Paraná. Os quadrados verdes representam os locais de coletas com suas respectivas numerações, as quais indicam os rios amostrados: Mogi Guaçu (1-4), Grande (5),

Turvo (6), Claro/ Paranaíba (7), Verde/Paranaíba (8), Tietê (9-10), Piracicaba/Tietê (11), Paraná (12-14). Para maiores informações ver Tabela 2.1.

De indivíduo foi retirada uma pequena fração de tecido da nadadeira, que em seguida foi preservada em etanol 96%. Os tecidos foram depositados no Banco de Tecidos mantido pelo Laboratório de Biologia Molecular e Conservação (LabBMC), do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. As amostras foram obtidas utilizando-se equipamentos da pesca artesanal como tarrafa, anzol e rede, e em colaboração com pescadores locais. Após a coleta das nadadeiras, os peixes foram liberados no rio. As informações referentes aos rios amostrados, ao número de amostras por ponto de coleta e à data de coleta para as duas espécies são apresentadas nas tabelas 2.1 e 2.2, respectivamente.

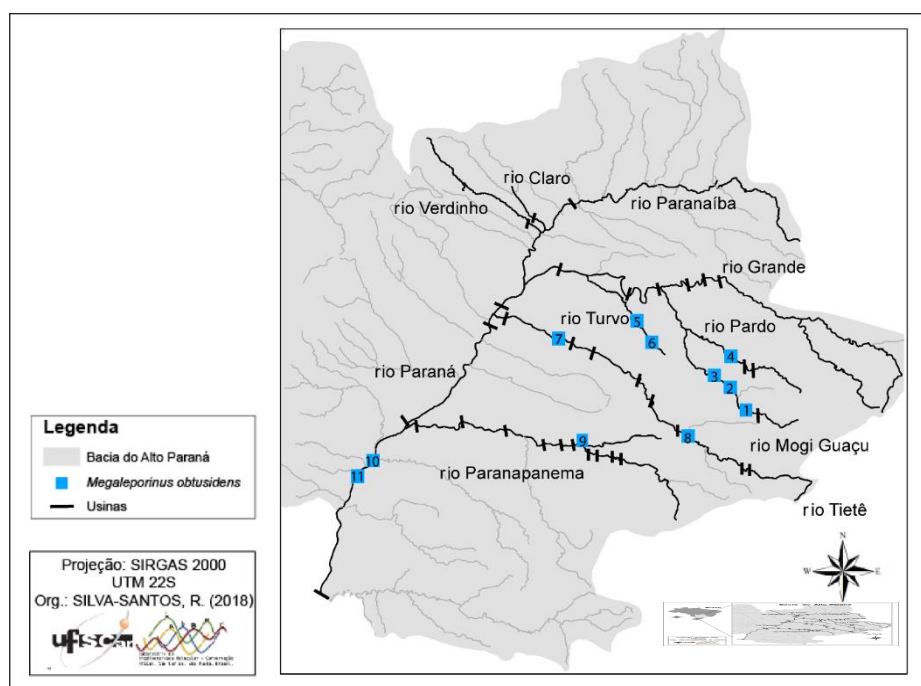


Figura 2.4 Bacia do alto rio Paraná indicando os sítios de coleta das amostras de *Megaleporinus obtusidens*. Os quadrados azuis representam os pontos de coletas com suas respectivas numerações, as quais indicam os rios amostrados: Mogi Guaçu (1-4), Turvo (5-6), Tietê (7-8), Paranapanema (9), Paraná (10-11). Para maiores informações ver Tabela 2.2.

Tabela 2.1 Amostragem de *Leporinus cf. friderici* Paraná. Os dados fornecidos são referentes aos rios amostrados, latitude, longitude, mês/ano da coleta, número de indivíduos utilizados para as análises com dados de DNA mitocondrial, D-loop (N_{mit}), número de indivíduos utilizados nas análises com os dados de microssatélites (N_{mic}), número total de indivíduos coletados, por ponto amostral (N) e o número referente ao ponto amostral da Figura 2.3.

Amostragem de <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná							
Rio	Latitude	Longitude	mês/ano	N_{mit}	N_{mic}	N	Número referente ao ponto amostral da Figura 2.3
Mogi Guaçu	21°53'12"S	47°46'58"W	abr/97	2	4	4	1
Mogi Guaçu	21°55'1,64"S	47°20'33,76"W	fev/16	7	11	11	2
Mogi Guaçu	21°55'38,6"S	47°21'58,4"W	mar/14	3	3	3	3
Mogi Guaçu	21°56'22,44"S	47°19'21,60"W	nov/97 a abr/98	3	3	3	4
Grande	20°13'6,59"S	49°16'16,59"W	mar/15	13	13	13	5
Turvo	20°48'39,67"S	49° 4'39,68"W	nov/2014 a abr/2015	20	20	20	6
Claro/Paranaíba	19° 7'2,08"S	50°38'33,87"W	dez/16	6	9	9	7
Verde/Paranaíba	19° 8'26,96"S	50°45'4,19"W	dez/16	5	10	10	8
Tietê	21° 6'14,24"S	50°16'15,84"W	out/15	7	7	7	9
Tietê	21°51'20,14"S	48°56'56,24"W	out/15 a fev/16	3	5	5	10
Piracicaba/Tietê	22°43'10,29"S	47°39'19"W	fev/14	3	3	3	11
Paraná	23°25'12"S	53°54'23"W	set/12	9	17	17	12
Paraná	23°21'38,81"S	53°45'12,30"W	set/12	9	11	11	13
Paraná	21°08'30,37" S	51°48'43,80"W	set/12	3	4	4	14
Total				93	120	120	

Tabela 2.2 Amostragem de *Megaleporinus obtusidens*. Os dados fornecidos são referentes aos rios amostrados, latitude, longitude, mês/ano da coleta, número de indivíduos utilizados para as análises com dados de DNA mitocondrial, D-loop (N_{mit}), número de indivíduos utilizados nas análises com dados de microssatélites (N_{mic}), número total de indivíduos coletados, por ponto amostral (N) e o número referente ao ponto amostral mapa da Figura 2.4.

Amostragem de <i>Megaleporinus obtusidens</i>							
Rio	Latitude	Longitude	Data	N_{mit}	N_{mic}	N	Número referente ao ponto amostral da Figura 2.4
Mogi Guaçu	22°22'46,76"S	46°54'2,78"W	fev/16	5	22	22	1
Mogi Guaçu	21°55'1,64"S	47°20'33,76"W	nov/97 a fev/98	5	7	7	2
Mogi Guaçu	21°55'1,64"S	47°20'33,76"W	jul/98	4	8	8	3
Pardo/Mogi Guaçu	21°37'13,07"S	47°0'29,99"W	nov/15	0	3	3	4
Turvo	20°25'24,0"S	49°15'16,6"W	fev/11	6	6	6	5
Turvo	20°48'39,67"S	49°4'39,68"W	nov/14 a mar/15	21	21	21	6
Tietê	21°6'14,24"S	50°16'15,84"W	out/15	5	7	7	7
Tietê	22°35'36,46"S	48°22'28,75"W	out/15	10	22	22	8
Paranapanema	22°54'1,25"S	49°59'49,35"W	jul/98	5	13	13	9
Paraná	23°21'38,81"S	53°54'23"W	set/12	2	2	2	10
Paraná	23°25'12"S	53°54'23"W	jan/13	10	10	10	11
Total				73	121	121	

2.3.3 Extração de DNA e amplificação dos marcadores moleculares (D-loop e microssatélites)

O DNA total foi extraído seguindo o protocolo proposto por Aljanabi & Martinez, (1997). O protocolo completo está apresentado no material suplementar Protocolo S2.1. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose com concentração 1% e visualizado sob luz ultravioleta. A concentração do DNA foi medida em biofotômetro (BioPhotometer Eppendorf).

A amplificação da região D-loop foi realizada sob as seguintes condições de reação: Tampão 1x, 2,0mM de MgCl₂, 0,25mM de dNTPs, 0,4mM de cada *primer*, 1U de Taq DNA polimerase PlatinumTM (Invitrogen), em um volume final de 12,5µl. O ciclo de amplificação consistiu de 94°C durante 4 minutos, 35 ciclos de 92°C por 45 s, 52°C por 45 s, 72°C por 45 s e temperatura de extensão final de 72°C por 7 minutos. Foram utilizados os *primers* FishDloopF 5'-ATAAAGCATCGGTCTTGTA-3' e FishDloopR5'-GTAAAGTCAGGACCATGCCT-3' (PIRES et al., 2017). Os produtos de PCR foram purificados segundo o protocolo proposto por Kusukawa et al. (1990), descrito no material suplementar Protocolo S2.2. O sequenciamento foi feito em sequenciador ABI3730XL (Applied Biosystems).

Para os marcadores de microssatélites, nós utilizamos doze *primers* cujas informações mais detalhadas são mostradas no material suplementar (Tabelas S2.1 e S2.2). Os *primers* Lobt 01, Lobt 06, Lobt 08, Lobt 09 (OLIVEIRA; LIMA; COIMBRA, 2015), Lolar 5, Lolar 8 e Lolar 15 (VILLANOVA et al., 2015) foram desenvolvidos para a espécie *Megaleporinus obtusidens* e os *primers* Lmac 02, Lmac 05, Lmac 06, Lmac 07 e Lmac 08 (MORELLI et al., 2007) foram desenvolvidos para a espécie *M. macrocephalus*. Todos os *primers* utilizados tiveram a adição de uma cauda M13, em uma das extremidades 5' (*forward* ou *reverse*), seguindo o protocolo desenvolvido por Schuelke (2000). Os *primers* que foram desenvolvidos para outras espécies que não as desse estudo, tiveram suas regiões de interesse sequenciadas a fim de se confirmar os *motifs* de microssatélites e validar a transferibilidade dos mesmos.

As reações de amplificação dos locos de microssatélites foram realizadas para um volume final de 10µl, utilizando 1µl de DNA com 50ng de concentração, Tampão KCl 1x do Kit da GoTaq® G2 (Promega). A concentração de MgCl₂ foi de 1,5mM, 0,25mM de dNTPs, 1µl de cada *primer* (o *primer* com a cauda M13 em uma concentração de

2pmol e o *primer* sem a cauda M13 em uma concentração de 8pmol). Foram adicionados também 1 µl do iniciador M13 à 8pmol de concentração (FAM, NED, PET, VIC ou HEX) e 0,5U de GoTaq® G2 DNA Polimerase (Promega). Nas reações com os *primers* Lolar 15 e Lobt 09 utilizou-se 2,5mM de MgCl₂. Os ciclos de amplificação seguiram diferentes condições. Para os *primers* Lobt a reação foi de 4 minutos a 94°C, seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura de anelamento, 1 minuto a 72°C. Para os *primers* Lmac foram usou-se 2 minutos a 94°C seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura de anelamento, 30 segundos a 72°C. Para os *primers* Lolar foram usados 4 minutos a 95°C seguidos por 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 50 segundos na temperatura de anelamento (Tabela S2.2), 50 segundos a 70°C. Para todos os ciclos foi adicionado o ciclo da cauda M13, sendo esse composto por 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C e uma etapa final de 10 minutos a 72°C. As genotipagens foram realizadas em distintos sequenciadores, ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) e ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Os alelos foram definidos e padronizados com ET-ROX genescan 550-R como marcador de peso molecular, no programa Geneious v 6.1.8 (KEARSE et al., 2012).

2.3.4 Análises com o marcador D-loop

2.3.4.1 Estrutura populacional

As sequências foram editadas e alinhadas no programa Geneious (KEARSE et al., 2012) utilizando a ferramenta ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) assumindo as penalidades de 15 e 6,66 para abertura e extensão de *gaps*, respectivamente.

A verificação de estruturação populacional foi investigada utilizando-se diferentes abordagens, incluindo a análise de inferência bayesiana de delimitação de grupos realizada no software BAPS (CORANDER et al., 2008). Essa análise utiliza as frequências nucleotídicas das sequências de DNA e o número de grupos geneticamente divergentes em uma população para inferir uma probabilidade posterior do número de *clusters* (K) dentro de uma amostragem. A opção utilizada foi a de *Clustering of groups of individuals*, na qual são fornecidos os dados de origem das amostras (rio amostrado) como informação *a priori*. Para a espécie *L. cf. friderici* Paraná nós testamos valores de K =1 a 7 e para a espécie *M. obtusidens* o K testado variou de 1 a 5. Esses valores foram baseados no número de rios amostrados. Todos os valores de K foram replicados dez

vezes e os melhores valores foram escolhidos a partir do maior valor de $\log \textit{likelihood} - \log(\text{ml})$ e maior valor probabilidade posterior.

Nós calculamos também os valores de F_{st} par a par para cada par de sub-bacia amostrada. Essa análise foi conduzida no programa Arlequin 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) que utiliza a estatística F de Wright, com 10.000 permutações.

A relação entre os haplótipos obtidos também foi investigada a partir da construção de uma rede no programa PopArt (LEIGH; BRYANT, 2015) com base no método de *Median-Joining* (BANDELT et al., 1999).

2.3.4.2 Diversidade genética

Dados referentes aos índices de diversidade haplotípica (H_d , NEI, 1987), diversidade nucleotídica (π , NEI; TAJIMA, 1981), número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências (K); número de haplótipos (h) e o número de sítio polimórficos (S) para cada sub-bacia amostrada foram estimados no programa *DNA Sequence Polymorphism- DNAsp v 6.10.04* (ROZAS et al., 2017).

2.3.4.3 Análises demográficas

Nós realizamos testes de neutralidade seletiva, D (TAJIMA, 1989) e F_s de Fu (FU, 1997), para as sequências da região D-loop. O teste D compara o número de sítios polimórficos com a média da distribuição dos pares de diferenças entre as sequências. A diferença D entre essas estimativas pode detectar desvios da neutralidade, sendo que valores negativos sugerem seleção positiva, negativa ou expansão populacional. O teste F_s de Fu, compara o número de alelos observados com o número de alelos esperados em uma amostra aleatória, permitindo identificar alelos raros. Valores de F_s de Fu tendem a ser negativos mediante um excesso de mutações recentes, indicando expansão populacional. Essas análises foram realizadas no software Arlequin v.3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

A história demográfica das espécies foi estimada também a partir de uma análise de *Mismatch Distribution – MD* (ROGERS; HARPENDING, 1992). Essa análise avalia como as mudanças no tamanho populacional afetam o número médio de diferenças entre

os pares de sequências de DNA dos indivíduos, comparando a distribuição das diferenças nucleotídicas observadas em relação às esperadas entre os haplótipos (ROGERS; HARPENDING, 1992). A análise MD leva em consideração o modelo de sítios infinitos, no qual cada mutação ao longo do tempo evolutivo, entre dois indivíduos, aumenta o número de diferenças entre eles e leva em consideração três parâmetros: θ_0 , θ_1 (θ antes e depois do crescimento populacional) e, τ , tempo desde a expansão ou retração, expresso em unidade mutacional (ROGERS; HARPENDING, 1992). São possíveis dois tipos de resultados: um gráfico com padrão multimodal ou unimodal. O padrão multimodal representa uma população em um equilíbrio demográfico. Enquanto que o gráfico com padrão unimodal, resultado da acumulação de mutações com perda mínima de linhagens (CASSONE; BOULDING, 2006), representa uma população que sofreu expansão populacional ou sofreu uma expansão do *range* com níveis altos de migração entre grupos com *pools* gênicos diferentes (ROGERS; HARPENDING, 1992). Essa análise foi realizada no programa DNAsp v 6.10.04. A concordância e a significância entre os resultados esperados e observados sob o modelo de expansão repentina foram testados por meio da *Sum of Squared Differences-SSD* e do índice de Raggedness (r) (HARPENDING, 1994) no programa Arlequin v 3.5.2.2. Valores significativos para esses dois índices rejeitam a hipótese de expansão populacional.

Além das análises citadas acima, nós também inferimos sobre a história demográfica das populações de *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens* por meio da análise de *Bayesian Skyline Plot* - BSP (DRUMMOND et al., 2005) implementada no BEAST v.2.4.4 (BOUCKAERT et al., 2014). Essa análise estima as mudanças no tamanho efetivo populacional ao longo do tempo por meio de um dado modelo de substituição nucleotídica e investiga a presença de oscilações demográficas históricas nas populações. A BSP utiliza uma abordagem de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) e inclui intervalos de confiança para o tamanho populacional estimado em cada ponto no tempo. Esses intervalos representam as incertezas filogenéticas e coalescente da abordagem. Essa análise foi conduzida por meio de três corridas independentes de 30 milhões de MCMC, amostradas a cada 3000 cadeias, combinadas no LogCombiner v2.4.6 e reduzidas com 20% de *burnin-in*. A identificação do modelo evolutivo para as sequências de D-loop foi feita no programa Jmodeltest v2.1.4 (DARRIBA et al., 2012) por meio do *Bayesian Information Criterion* (BIC). Para checar a convergência das cadeias e também verificar se o tamanho efetivo da amostragem (ESS – *effective sample size*) de parâmetros

importantes (probabilidade posterior, priori e likelihood) estavam adequados para as nossas estimativas ($ESS > 200$), utilizamos o Tracer (RAMBAUT et al., 2014). A taxa mutacional utilizada foi de 0,0167/sítio/milhão de ano, indicada por Sivasundar, Bermingham e Orti (2001) e calculada para as espécies de *Prochilodus*.

2.3.5 Análises com os marcadores microssatélites

2.3.5.1. Estrutura populacional

Para investigar a existência de diferentes *clusters* genéticos dentro da amostragem para cada espécie realizamos inicialmente a análise *Discriminant Analysis of Principal Components* – DAPC (JOMBART et al., 2008). Essa análise tem a característica de sumarizar a diferenciação genética entre grupos, enquanto minimiza a variação genética dentro deles (JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010), independente de haver correlação entre as variáveis (desequilíbrio de ligação). Para essa análise foi usado o pacote Adegenet (JOMBART, 2008), implementado no programa R (R CORE TEAM, 2017). Primeiro, foi calculada a quantidade de grupos genéticos presentes na amostragem sem informação *a priori* de grupos. Posteriormente, nós realizamos a análise de DAPC para descrever os grupos genéticos, definindo o número máximo de *clusters* como o valor encontrado previamente. Foram calculadas as probabilidades de associação de cada indivíduo, e cada indivíduo foi atribuído a um *cluster* usando sua probabilidade de associação máxima.

Também foi utilizada a técnica de *clusters* bayesianos, auxiliada pelo algoritmo MCMC presente no programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Essa análise estima o número de grupos genéticos dentro da sua amostragem com base nas frequências alélicas dadas, minimizando o desequilíbrio de ligação entre os locos, e maximizando o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* dentro de cada grupo. A análise no STRUCTURE foi realizada sem fornecermos informação *a priori* da origem dos indivíduos. Foram testados valores de K variando de 1 a 14 (número total de pontos amostrais) para a espécie *L. cf. friderici* Paraná e K= 1 a 11 (número total de pontos amostrais) para a espécie *M. obtusidens*. Tais valores de K foram replicados dez vezes. As análises foram realizadas por meio de 1.000.000 de cadeias, após um período inicial (*burnin-in*) de 300.000 interações. Utilizamos o modelo ancestral *Admixture*, ideal para ser usado quando se tem populações cujo fluxo gênico se fez ou ainda se faz presente.

Essa abordagem permite identificar potenciais ‘ancestrais’ dos indivíduos em mais de uma população. Além do modelo ancestral, utilizamos também o modelo de frequências alélicas correlacionadas, que pressupõe que as populações divergiram de um ancestral comum. Os demais parâmetros foram configurados de acordo com o *default* do programa. O logaritmo de probabilidade dos dados LnP (D/K) (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) e as estimativas de DeltaK (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) foram determinados a partir do programa Structure Harvest (EARL; VONHOLDT, 2012), disponível em <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>, e utilizados para obtermos o valor de K ótimo. O gráfico de atribuição dos indivíduos foi visualizado no programa Clumpak (Cluster Markov Packager Across K) que gera um gráfico consenso baseado em uma matriz de similaridade das execuções replicadas dos valores de K (KOPELMAN et al., 2015).

A fim de visualizarmos a similaridade dos indivíduos no espaço nós realizamos a análise de correspondência multidimensional fatorial (FCA) obtida através do programa GENETIX 4.02 (BELKHIR et al., 2004). Essa análise possibilita a visualização dos indivíduos no espaço a partir da similaridade entre seus alelos. Aqui nós avaliamos a similaridade dos indivíduos dentro dos grupos genéticos obtidos na análise de DAPC.

Outras análises que permitem verificar a diferenciação genética entre grupos são os índices F_{st} (WEIR; COCKERHAM, 1984) e as estimativas de diferenciação genética de Jost (JOST, 2008), o D_{est} . Esses índices foram calculados entre os pares de sub-bacias amostradas (as amostras do rio Mogi Guaçu foram separadas em dois grupos temporalmente distintos: reunindo os indivíduos dos pontos 1 e 4 e os dos pontos 2 e 3 para cada espécie). Os índices de diferenciação também foram calculados entre os grupos genéticos obtidos na análise de DAPC. O software ARLEQUIN foi usado para estimar os valores de F_{st} e os valores de D_{est} foram obtidos a partir do pacote DEMETics (GERLACH et al., 2010), com 10.000 réplicas.

2.3.5.2 *Diversidade genética*

Todos os índices de diversidade genética foram estimados para as sub-bacias amostradas (as amostras do rio Mogi Guaçu foram separadas nos mesmos dois grupos temporalmente diferentes descritas na seção 2.3.4.1) e para os grupos genéticos encontrados na análise de DAPC. O número de alelos (A), alelos efetivos (A_e), alelos

privados (A_p), os valores de heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o) foram calculados no programa GENALEX 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). No programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001) foram calculados a riqueza alélica (R_a), índice que estima o número de alelos calculados por rarefação (GOUDET, 2001), e o índice de endocruzamento (F_{is}), bem como os valores de p para o excesso e para o déficit de heterozigotos. A presença de alelos nulos foi checada no software MICRO-CHECKER (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Os testes para desvios do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e desequilíbrio de ligação entre os pares de locos foram realizados através do programa GENEPOP (RAYMOND, M.; ROUSSET, 1995), com 10.000 repetições, tendo os valores de p corrigidos seguindo o procedimento de Bonferroni (RICE, 1989). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada um dos locos foi avaliado no programa Cervus (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007).

2.3.5.3 Análises demográficas

A possível ocorrência de uma recente redução populacional foi investigada através de dois testes. O primeiro, o teste de Wilcoxon, implementado no programa BOTTLENECK (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999; CORNUET; LUIKART, 1996), é considerado o mais apropriado e robusto quando se está trabalhando com tamanhos amostrais pequenos, utilizando-se menos de vinte locos de microssatélites (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999; CORNUET; LUIKART, 1996; ANMARKRUD, 2008). Esse teste tem como hipótese nula um excesso de heterozigosidade não significativo (ausência de gargalo populacional). O modelo de mutação atuando sob os locos aqui utilizados foi selecionado a partir da análise do comportamento das frequências alélicas. Para o modelo de mutação IAM (*Infinite Allele Model*) as mutações nos microssatélites podem criar um número infinito de estados alélicos não presentes na população (ANMARKRUD et al., 2008). Nesse modelo existe um pico alto para as frequências de um ou dois alelos, enquanto que os outros aparecem em frequências bem inferiores (OLIVEIRA et al., 2006). Para o modelo de SMM (*Stepwise Mutation Model*) as mutações nos microssatélites têm igual probabilidade de permitir o ganho ou a perda de uma unidade repetitiva (ANMARKRUD et al., 2008). No SMM ocorre a presença de um pico de frequência alélica maior, que diminui gradativamente à medida que se avança nos demais alelos (OLIVEIRA et al., 2006). O terceiro modelo de mutação é o TPM (*Two Phase Mutation*), uma extensão do modelo SMM, que considera a probabilidade de uma

mutação num microssatélite envolver mais de uma unidade repetitiva (DI RIENZO et al., 1994). Aqui nós utilizamos os parâmetros de 95% de SMM em TPM e 12% de variância para TPM, como sugerido por Piry (1999), com 10.000 réplicas.

O segundo teste realizado foi o da análise qualitativa da distribuição dos alelos em classes de frequências alélicas (LUIKART et al., 1998). Esse método se baseia na distorção da distribuição das frequências alélicas em uma população que sofreu um gargalo populacional. Uma população que exibe um equilíbrio entre mutação e deriva genética tem uma grande proporção de alelos na classe de baixa frequência, 0 a 0,10, ao passo que uma população que sofreu um gargalo populacional recente, exibe maior quantidade de alelos em classes de frequências intermediárias, 0,101 a 0,90 (LUIKART et al., 1998).

2.4 Resultados

2.4.1 *Leporinus cf. friderici* Paraná

2.4.1.1 Marcador mitocondrial D-loop

Um total de 93 sequências, com comprimento de 963 pb foi obtido para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. O número de indivíduos sequenciados para cada ponto amostral é mostrado na tabela 2.1.

Os resultados da análise de BAPS com informação *a priori* das sub-bacias amostradas, indicam que na bacia do alto rio Paraná, existe apenas um grupo genético de *L. cf. friderici* Paraná (Figura 2.5). O $K = 1$ apresentou valores de probabilidade posterior e de log (ml) iguais a 0,99 e -628,48, respectivamente. O segundo melhor valor de log (ml) foi -637,0233 para $K=2$.

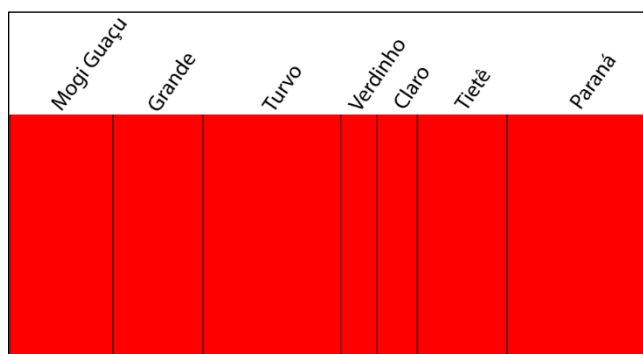


Figura 2.5 Análise de *clusterização* por Inferência Bayesiana realizada no BAPS para as seqüências D-loop de *Leporinus cf. friderici* Paraná a nível de *Clustering of groups of individuals*. Nesse *output* cada indivíduo é representado por uma barra vertical e os possíveis grupos genéticos assumem cores diferenciadas. Aqui, todos os indivíduos pertencem ao mesmo grupo genético configurado na cor vermelha.

O índice de diferenciação de F_{st} par a par para cada par de sub-bacia amostrada foi significativo entre as amostras dos rios Mogi Guaçu e Grande ($F_{st} = 0,1548$, $p = 0,00653$) e entre os rios Mogi Guaçu e Paraná ($F_{st} = 0,06818$, $p = 0,02950$). Além desses, os peixes da sub-bacia do rio Tietê apresentaram maior quantidade de valores significativos em relação aos demais rios, com valores de $F_{st} = 0,0922$, $p = 0,02822$, com o rio Turvo e de $F_{st} = 0,2217$, $p = 0,00079$ com o rio Grande (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Valores de F_{st} entre os pares de sub-bacias amostradas para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná com os dados de D-loop.

Sub-bacias	Mogi Guaçu	Grande	Turvo	Verdinho	Claro	Tietê
Mogi Guaçu						
Grande	0,1548*					
Turvo	0,03726	0,00000				
Verdinho	0,09091	0,00000	0,00000			
Claro	0,13304	0,00000	0,00000	0,00000		
Tietê	0,00000	0,22177*	0,09226*	0,18175*	0,20818*	
Paraná	0,06818*	0,00974	0,00000	0,00000	0,01965	0,12567*

* Valores significativos no nível de significância $p < 0,05$ em 10.000 permutações.

Foi encontrado um total de quarenta haplótipos para *L. cf. friderici* Paraná (Figura 2.6). Desses, quinze (H1, H3, H5 a H9, H12 a H15, H17 a H19, H23 e H29) foram compartilhados entre indivíduos de diferentes rios e vinte e cinco foram exclusivos a alguns rios. Dentre os haplótipos exclusivos, quatro (H2, H4, H8 e H10) estão presentes no rio Mogi Guaçu, sendo dois deles observados apenas nas amostras coletadas no início dos anos 2000. Foram também encontrados dois haplótipos exclusivos (H11 e H16) no rio Grande, três (H20, H21 e H22) no rio Turvo, um (H24) no rio Verdinho, dois (H25 e H26) no rio Claro, cinco (H27, H28, H30, H31 e H32) no rio Tietê e oito (H33 ao H40) no rio Paraná. Nenhum haplótipo foi encontrado em todos os rios amostrados. A tabela S2.3 contém todas as informações dos haplótipos com seus respectivos sítios polimórficos.

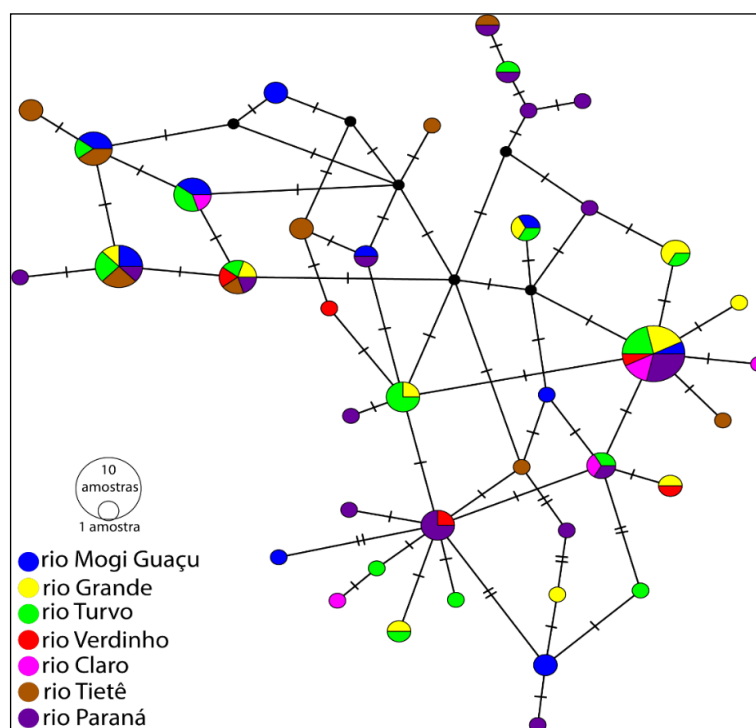


Figura 2.6 Rede de haplótipos construída com os dados de sequências de D-loop para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná a partir do método de *Median-Joining*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. Os traços representam o número de mutações entre os haplótipos. Os círculos em preto representam haplótipos não amostrados que foram inferidos pela análise (“median vectors”). As cores indicam os rios de coleta detalhados na legenda.

Com relação aos índices de diversidade genética, foram verificados nas 93 sequências analisadas vinte e seis sítios polimórficos, dos quais 16 são

parcimoniosamente informativos. O valor da diversidade haplotípica (H_d) entre as sub-bacias variou de 0,933 a 1,000, tendo como valor médio total $H_d = 0,958$. Os valores da diversidade nucleotídica (π) estiveram entre 0,27% e 0,38%, assumindo um valor total de $\pi = 0,37\%$. O valor total do número médio de diferenças nucleotídicas foi 3,621. Os índices de diversidade genética calculados para cada sub-bacia amostrada são detalhados na tabela 2.4.

Tabela 2.4 Índices de diversidade genética calculados para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná com os dados de D-loop para cada sub-bacia amostrada.

Sub-bacias	N	h	k	S	H_d	π (%)
Mogi Guaçu	15	10	3,82	11	0,952	0,398
Grande	13	10	3,026	12	0,949	0,315
Turvo	20	14	3,295	13	0,958	0,342
Verdinho	5	5	2,8	6	1	0,291
Claro	6	5	3,067	8	0,933	0,318
Tietê	10	7	2,689	8	0,933	0,279
Paraná	21	16	3,724	16	0,957	0,387
Total	93	40	3,621	26	0,958	0,376

N= número de indivíduos, h= número de haplótipos, k= número médio de diferenças nucleotídicas, S= número de sítios polimórficos, H_d = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica.

O teste de neutralidade D de Tajima apresentou um valor negativo, porém não significativo de $D = -0,87315$ ($p = 0,20$); já o de F_s de F_u apresentou um valor negativo e significativo, com $F_s = -26,07938$ ($p = 0,00$). A curva de distribuição das diferenças par a par entre os pares de sequências analisadas apresentou um formato unimodal e o índice de ajuste entre as duas curvas foi significativo, com $SSD = 0,004620$ ($p = 0,011$), enquanto que o índice r não foi significativo, sendo $r = 0,02262$ ($p = 0,073$) (Figura 2.7).

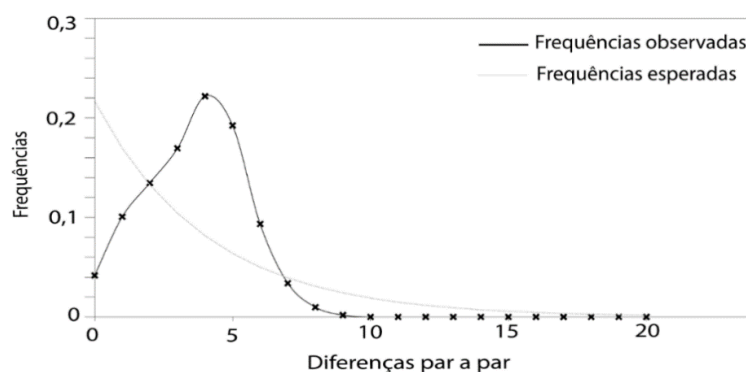


Figura 2.7 Análise de *Mismatch Distribution* para as 93 sequências D-loop de *Leporinus cf. friderici* Paraná. Distribuição da frequência do número de diferenças entre os pares de sequências (SSD = 0,004620, $p = 0,011$; índice de Raggedness = 0,02262, $p = 0,073$).

Para a análise de BSP o modelo evolutivo selecionado e utilizado foi o HKY+I. O gráfico de BSP indica que *L. cf. friderici* Paraná vem passando por um aumento no tamanho efetivo populacional ao longo dos últimos cem mil anos, sendo esse aumento mais acentuado nos últimos cinquenta mil anos (Figura 2.8).

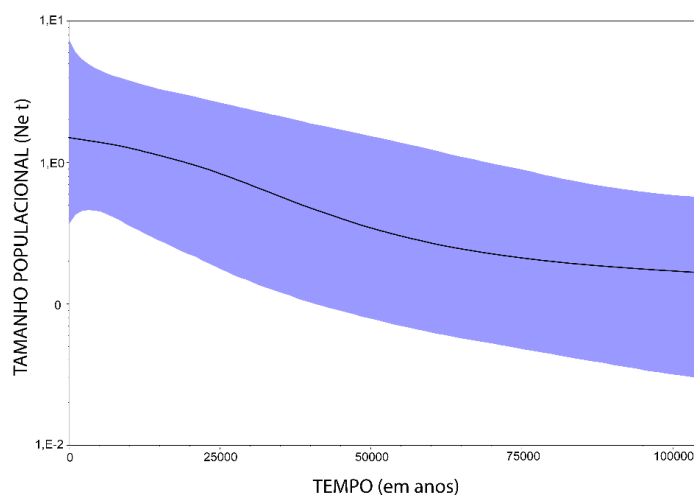


Figura 2.8 Análise de *Bayesian Skyline Plot* mostrando as mudanças no tamanho efetivo populacional pelo tempo geracional nos últimos cem mil anos para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. O eixo X representa o tempo em anos enquanto que o eixo Y traz a informação do produto do tamanho efetivo populacional (N_e) e o tempo de geração por milhão de ano (t) em uma escala log. A linha preta sólida indica a estimativa média e a área em azul o intervalo de maior densidade posterior (95%).

2.4.1.2 Marcadores microsatélites

2.4.1.2.1 Estruturação populacional

Do total de 12 marcadores de microsatélites testados, nove apresentaram padrões de amplificação satisfatórios na espécie *L. cf. friderici* Paraná. Como estes locos haviam sido previamente prospectados para outras espécies da família Anostomidae, os produtos de sua amplificação foram também sequenciados. Os resultados do sequenciamento das regiões amplificadas mostraram os *motifs* de repetição de microsatélites. Entretanto, dos nove locos analisados, quatro sofreram modificações com relação à descrição do motivo original (Lobt 06, Lobt 08 e Lmac 02). Mais detalhes estão disponíveis na tabela S2.1, do material suplementar.

As análises de *clusterização* foram realizadas utilizando 120 indivíduos e os nove locos de microsatélites validados neste trabalho. O resultado da análise de DAPC para encontrar o valor ótimo do número de K dentro da nossa amostragem foi $K = 3$. A figura 2.9 mostra os gráficos contendo os resultados de melhor K, baseado no Critério de Informação Bayesiana (BIC) e os três *clusters* genéticos resultantes. O *cluster* 1 composto por 37 indivíduos, o *cluster* 2 por 49 indivíduos e o *cluster* 3 por 34 indivíduos.

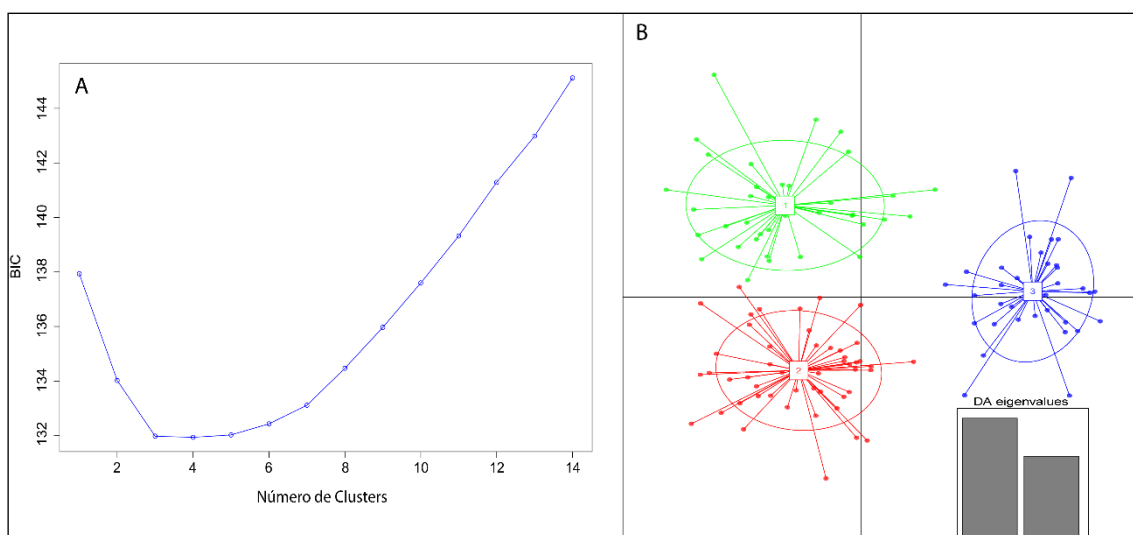


Figura 2.9 Análise de DAPC para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. **A)** valores de Critério de Informação Bayesiana (BIC) a partir de diferentes valores K usando os primeiros 20 componentes principais. O valor de K ideal é aquele que apresenta o menor valor de BIC ($K = 3$). **B)** Gráfico representando os indivíduos como os pontos e os *clusters* com as elipses. Cada *cluster* assume uma cor: *cluster* 1 em verde, *cluster* 2 em vermelho e *cluster* 3 em azul.

Não foram encontradas associações geográficas para os três *clusters* anteriormente descritos. O *cluster* 1 apresentou indivíduos de todos os rios amostrados, exceto do rio Claro. O *cluster* 2 agrupou indivíduos provenientes de todos os rios amostrados e o *cluster* 3 não apresentou indivíduos do rio Claro nem do rio Verdinho. A figura 2.10 mostra a quantidade de indivíduos por rio amostrado em cada *cluster* (A) e as probabilidades de associação dos indivíduos a cada um deles (B).

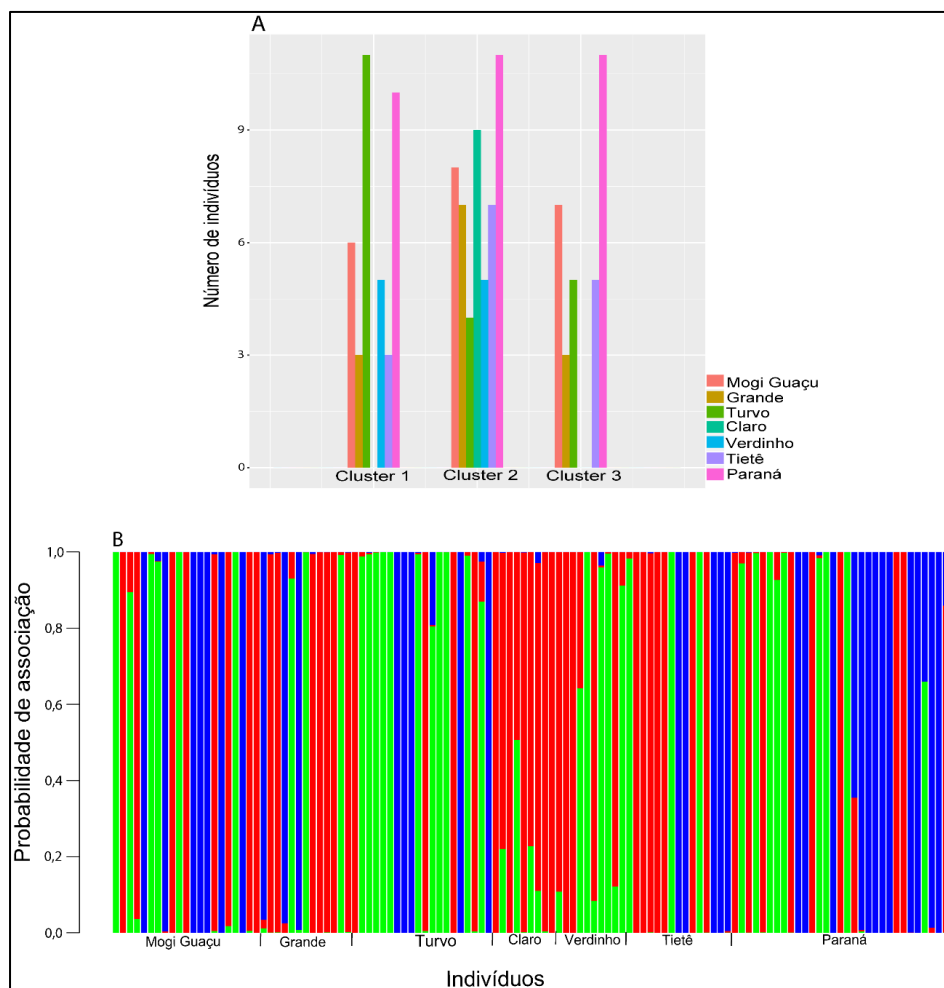


Figura 2.10 A) Quantidade de indivíduos de *Leporinus cf. friderici* Paraná por rio amostrado pertencente a cada *Cluster*. B) Probabilidade de pertencimento de cada indivíduo a cada *cluster*. Cada barra representa um indivíduo e as cores são referentes *cluster* 1 em verde, *cluster* 2 em vermelho e *cluster* 3 em azul.

Com relação as análises conduzidas no programa STRUCTURE, sem informação *a priori* da origem dos indivíduos, o resultado segundo a correção de Evanno (2005), baseando-se na taxa de mudança da probabilidade posterior dos dados entre sucessivos

valores de K , indica que o provável valor de grupos genéticos é $K = 3$, a partir do valor de $\Delta K = 10,75$. A figura S2.1 mostra os gráficos com os resultados das análises no STRUCTURE.

A análise de FCA que avaliou a distribuição espacial dos indivíduos dos *clusters* genéticos encontrados na análise de DAPC, demonstra que são necessários apenas dois fatores principais para que 100% da distribuição dos indivíduos no espaço fatorial seja explicada (Figura 2.11).

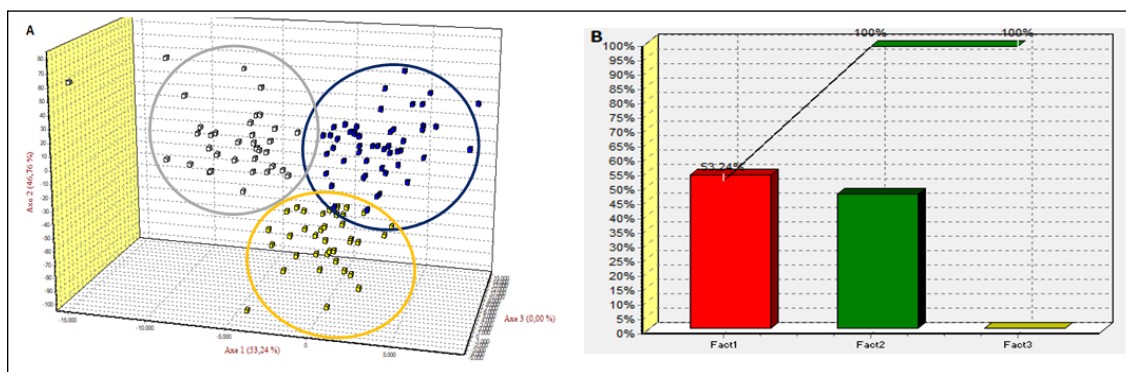


Figura 2.11 A) Análise de correspondência fatorial (FCA) para os indivíduos amostrados, segundo os *clusters* genéticos encontrados na análise de DAPC para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. Os indivíduos pertencentes ao *cluster* 1 estão representados em amarelo; os indivíduos pertencentes ao *cluster* 2 estão representados em azul e os indivíduos pertencentes ao *cluster* 3 estão representados em branco. B) Gráfico de barras indicando a porcentagem de contribuição de cada fator para a distribuição dos indivíduos no espaço fatorial. O fator 1 contribuiu com aproximadamente 52% e o fator 2 com 48%.

Quanto à presença de alelos nulos, o resultado da análise do MICRO-CHECKER indicou que ao se reunir toda a amostragem, os locos Lobt 01, Lobt 08, Lmac 02 e Lolar 15 apresentaram alelos nulos. Quando essa análise é feita por sub-bacia de coleta, os locos que acusam a presença de alelos nulos são diferentes entre elas. Entretanto, dentro dos *clusters* encontrados na análise de DAPC dois locos foram identificados com a presença de alelos nulos (Lmac 05 e Lobt 08) em todos eles. Portanto, esses dois locos foram retirados das análises a seguir.

Os resultados de F_{st} entre os pares de sub-bacias amostradas (Tabela 2.5) demonstraram que a única comparação que teve um valor significativo foi entre o rio

Mogi Guaçu (pontos 1 e 4) e as amostras do rio Claro, $F_{st} = 0,10320$, $p = 0,05$. Já os valores de D_{est} se mostraram mais significativos entre os pares de comparações ($0,057835 < D_{est} < 0,266512$), sendo observado valor significativo de D_{est} entre os pontos temporalmente muito distintos dentro do rio Mogi Guaçu ($D_{est} = 0,05944$, $p = 0,03$). O rio Claro foi o que apresentou os maiores valores de D_{est} significativos em relação aos demais rios ($0,15735 < D_{est} < 0,250447$).

Ao calcularmos os valores de F_{st} entre os *clusters* encontrados na análise de DAPC, as comparações que se apresentaram significativas e maiores que zero foram entre os *clusters* 1 e 3 ($F_{st} = 0,03957$, $p = 0,001$) e entre os *clusters* 1 e 2 ($F_{st} = 0,03495$, $p = 0,01$). O F_{st} calculado entre os *clusters* 2 e 3 foi zero. Quando olhamos para os valores de D_{est} todos os pares de comparações tiveram valores maiores que os de F_{st} e significativos entre todos os pares de comparações, variando de $0,103843 < D_{est} < 0,161851$ (Tabela 2.6).

Tabela 2.5 Valores de F_{st} (diagonal abaixo) e D_{est} (diagonal abaixo) entre os pares de sub-bacias amostradas para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná, utilizando os dados de microssatélites.

Sub-bacias	Mogi Guaçu (pontos 1 e 4)	Mogi Guaçu (pontos 2 e 3)	Grande	Turvo	Claro	Verdinho	Tietê	Paraná
Mogi Guaçu (pontos 1 e 4)		0,059448*	0,064083*	0,057835*	0,250447*	0,104285*	0,04131	0,079758*
Mogi Guaçu (pontos 2 e 3)	0,02892		0,025794	0,032774	0,266512*	0,064734*	0,056426*	0,020300
Grande	0,06443	0,000000		0,009574	0,157351*	0,028842	0,011677	0,020374
Turvo	0,05190	0,000000	0,00308		0,171734*	0,069768*	0,015294	0,010356
Claro	0,10320*	0,000000	0,000000	0,02343		0,172272*	0,113271*	0,214254*
Verdinho	0,06850	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,050390	0,038917
Tietê	0,03133	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,046023
Paraná	0,05933	0,03132	0,02056	0,000000	0,04809	0,01084	0,02265	

*Valores significativos para $p < 0,05$. Valores calculados a partir de 10.000 permutações.

Tabela 2.6 Valores de F_{st} (diagonal abaixo) e D_{est} (diagonal abaixo) entre os pares de *clusters* encontrados na análise de DAPC para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná utilizando os dados de microssatélites.

	<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 2</i>	<i>Cluster 3</i>
<i>Cluster 1</i>		0,103843*	0,161851*
<i>Cluster 2</i>	0,03957*		0,157704*
<i>Cluster 3</i>	0,03495*	0,000000	

*Valores significativos para $p < 0,05$. Valores calculados a partir de 10.000 permutações.

2.4.1.2.2 Diversidade genética

Os parâmetros genéticos calculados para os 7 locos selecionados para *Leporinus cf. friderici* Paraná mostram que o conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou entre 0,322 (Lmac 07) e 0,666 (Lobt 01). Foi encontrado um total de 46 alelos para total de indivíduos analisados. O número de alelos por loco variou de quatro (Lobt 06, Lmac 06 e Lmac 07) a onze (Lobt 01). As heterozigosidades médias observadas e esperadas foram $H_o = 0,476$ e $H_e = 0,545$, respectivamente. O valor médio do $F_{is} = 0,132$ foi positivo e significativo. Os valores de riqueza alélica, R_a , variaram de 3,586 a 10,207. Os locos Lolar 5 e Lolar 15 apresentaram valor de p significativo ($p = 0,034$) para desequilíbrio de ligação entre eles. Os resultados para cada loco são mostrados na tabela 2.7.

Tabela 2.7 Parâmetros de variação genética para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná, baseados em sete locos de microssatélites.

	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	119	106	103	108	116	94	106	107,428
A	11	4	7	4	4	8	8	6,571
Ae	3,509	2,113	2,271	1,953	1,645	2,042	2,656	2,313
H_o	0,630	0,518	0,582	0,435	0,353	0,478	0,330	0,476
H_e	0,715	0,526	0,559	0,487	0,392	0,510	0,623	0,545
F_{is}	0,123	0,020	-0,036	0,113	0,103	0,067	0,474*	0,132*
P_L	0,0143	0,3929	0,7286	0,0714	0,2429	0,2643	0,0071	0,0071
P_s	0,9929	0,6643	0,3857	0,9714	0,8429	0,8643	1,000	1,000
R_a	10,207	3,983	6,785	3,979	3,586	8,000	7,8878	6,344
PIC	0,666	0,427	0,488	0,432	0,322	0,479	0,589	0,486

N= número de indivíduos analisados, A= número de alelos, Ae= número de alelos efetivos, H_o = heterozigosidade observada, H_e = Heterozigosidade esperada, F_{is} = coeficiente de endocruzamento, P_L = p Larger, P_s = p Smaller, R_a = riqueza alélica e PIC= conteúdo de informação polimórfica. O nível de significância dos valores de F_{is} para o $p < 0,00714$. *Valores significativos (nível de significância $p < 0,05$).

Os valores de heterozigosidade esperada e observada ($0,397 < H_o < 0,561$ e $0,393 < H_e < 0,575$) não divergiram muito quando foi feita uma análise por sub-bacia amostrada. Os indivíduos do rio Tietê apresentaram o maior valor de riqueza alélica, $R_a = 2,699$. Entre as duas amostragens do rio Mogi Guaçu, temporalmente diferentes, a riqueza alélica foi maior para as amostras coletadas mais recentemente (pontos 2 e 3), R_a

= 2,410. Com relação ao desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* o loco Lolar 15 foi o que apresentou os valores de p significativos dentro das sub-bacias do Mogi Guaçu (ponto 2 e 3), Turvo, Tietê e Paraná. O rio Turvo evidenciou três alelos privados, com frequências de 2% a 11%; o rio Verdinho um, com 5% de frequência; o rio Tietê apresenta dois, com frequência de 3% a 6% e o rio Paraná cinco alelos privados com frequências inferiores a 4%. Um sumário desses resultados pode ser visualizado na tabela S2.4. A figura 2.12 mostra um gráfico indicando os valores médios dos índices de diversidade genética dentro das sub-bacias amostradas.

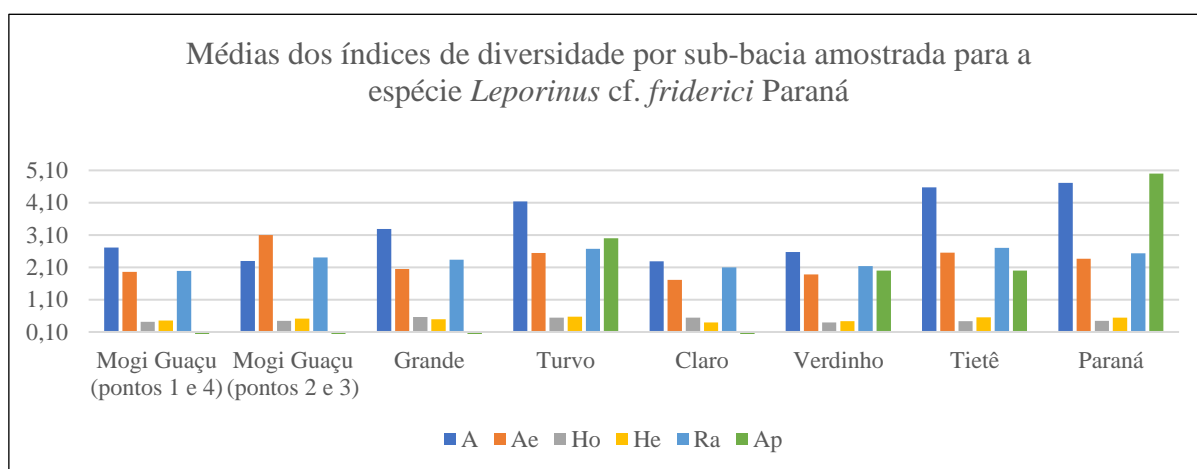


Figura 2.12 Gráfico dos índices das medias dos índices diversidade genética por sub-bacia amostrada para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. (A) número de alelos, (Ae) número de alelos efetivos, (Ho) heterozigosidade observada, (He) heterozigosidade esperada, (Ra) riqueza alélica e (Ap) alelos privados.

Ao analisarmos os parâmetros genéticos dentro dos *clusters* os maiores valores médios de Ho, Ra e A foram 0,514 (*cluster* 1), 4,707 (*cluster* 3) e 7,73 (*cluster* 3), respectivamente. Todos eles possuem alelos privados, sendo cinco observados nos *clusters* 1 e 2, com frequência de 1% a 6% e quatro no *cluster* 3, com frequências de 1% a 10%. Todos os parâmetros genéticos por *cluster* e para cada loco analisado, são apresentados na tabela 2.8.

Tabela 2.8 Parâmetros de variação genética para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná, baseados nos *clusters* obtidos na análise de DAPC e nos sete locos de microssatélites.

<i>Cluster 1</i>								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	36	32	30	36	30	32	36	34,44
A	8	3	10	2	7	5	12	6,222
Ae	3,219	1,889	7,860	1,492	2,145	1,490	4,612	3,037
Ho	0,638	0,437	0,666	0,25	0,433	0,312	0,611	0,514
He	0,689	0,470	0,872	0,329	0,533	0,329	0,783	0,571
Fis	0,087	0,086	0,252	0,255	0,205	0,066	0,233	0,115
P _L	0,2619	0,3595	0,8833	0,8738	0,1643	0,0405	0,4119	0,1500
P _S	0,8810	0,7976	0,2429	0,2238	0,9762	0,9929	0,8476	0,8524
P _{EHW}	0,4961	0,0284*	0,2016	0,0004*	0,1457	0,0037*	0,3279	-
Ra	7,223	2,978	4,979	3,96	2	6,975	4,838	4,707
<i>Cluster 2</i>								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	49	43	37	47	37	40	45	42,111
A	9	3	9	3	4	7	12	6,71
Ae	3,275	2,002	3,655	1,737	2,060	1,455	7,773	2,819
Ho	0,551	0,581	0,459	0,340	0,540	0,35	0,577	0,463
He	0,694	0,500	0,726	0,424	0,514	0,312	0,871	0,526
Fis	0,217	-0,150	0,379	0,208	-0,037	-0,106	0,347	0,131
P _L	0,0119	0,9143	0,8238	1,000	0,1048	0,6667	1,000	0,3952
P _S	0,9952	0,1690	0,2690	0,8190	0,9595	0,5048	0,2262	0,6071
P _{EHW}	0,0007*	0,3839	0,5863	1,000	0,2475	0,3829	1,000	-
Ra	7,168	2,864	3,705	2,622	2,574	3,73	6,125	4,112
<i>Cluster 3</i>								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	34	31	25	33	27	34	26	35,222
A	7	3	8	3	7	7	13	7,73
Ae	3,167	2,312	5,122	1,679	1,827	2,990	7,638	3,020
Ho	0,735	0,516	0,32	0,4848	0,444	0,323	0,461	0,487
He	0,684	0,567	0,804	0,404	0,452	0,665	0,869	0,568
Fis	-0,060	0,107	0,615	-0,184	0,037	0,525	0,484*	0,219
P _L	0,7857	0,2762	0,3833	0,9333	0,9452	0,5119	0,0024*	0,0571
P _S	0,3500	0,8333	0,7833	0,1833	0,2214	0,7643	1,000	0,9452
P _{EHW}	0,2727	0,4614	0,4891	0,3504	0,5512	0,0015*	0,0000*	-
Ra	6,541	3	4,799	3	2,818	7	6,985	4,877

N = número de indivíduos analisados, A = número de alelos, Ae = número de alelos efetivos, Ho = heterozigosidade observada, He = Heterozigosidade esperada, Fis = coeficiente de endocruzamento, P_L = p Larger, P_S = p Smaller, P_{EHW} = valores de p para os desvios do equilíbrio

de *Hardy-Weinberg*, Ra = riqueza alélica e PIC = conteúdo de informação polimórfica. O nível de significância dos valores de Fis para o $p < 0,00238$. *Valores significativos (nível de significância $p < 0,05$). **Valores significativos após correção de Bonferroni.

2.4.1.2.3 Aspectos demográficos recentes

A figura S2.2 evidencia um gráfico da distribuição das frequências alélicas por loco analisado. Segundo esse gráfico, os locos Lobt 01 e Lolar 15 apresentam frequências alélicas com comportamento atribuído ao SMM, com mudança gradual nas frequências alélicas entre os diferentes alelos. Por outro lado, os locos Lobt 06, Lmac 02, Lmac 06, Lmac 07 e Lolar 5 apresentam um comportamento de frequências alélicas atribuído aos locos que estão sob IAM, prevalência de um ou dois alelos em maior frequência. Portanto, o modelo de mutação selecionado no resultado da análise de *Bottleneck* foi o TPM. A tabela 2.9 mostra os valores de p da análise de *Bottleneck*, para os *clusters* encontrados na análise de DAPC. Segundo essa análise, para o modelo de mutação selecionado, não há indícios de uma redução recente no tamanho populacional, pois nenhum valor de p foi significativo para o excesso de heterozigosidade dentro do modelo de mutação selecionado.

Tabela 2.9 Valores de p para a análise de *Bottleneck* nos *clusters* de *Leporinus cf. friderici* Paraná, segundo os diferentes modelos de mutações. IAM (Alelos Infinitos), SMM (*Stepwise Mutation*) e TPM (*Two Phase Mutation*). *Valores significativos $p < 0,05$.

Cluster	Teste Wilcoxon		
	IAM	SMM	TPM
<i>Cluster 1</i>			
Déficit de heterozigosidade	0,59375	0,05469	0,05469
Excesso de heterozigosidade	0,46875	0,96094	0,96094
Déficit e excesso de heterozigosidade	0,93750	0,10938	0,10938
<i>Cluster 2</i>			
Déficit de heterozigosidade	0,53125	0,01953*	0,01953*
Excesso de heterozigosidade	0,53125	0,98828	0,98828
Déficit e excesso de heterozigosidade	1,000	0,03906*	0,03906*
<i>Cluster 3</i>			
Déficit de heterozigosidade	0,94531	0,02734*	0,02734*
Excesso de heterozigosidade	0,14844	0,98047	0,98047
Déficit e excesso de heterozigosidade	0,29688	0,05469	0,05469

A figura 2.13 mostra um gráfico com a distribuição das frequências alélicas em classes de frequências. Segundo essa análise, o gráfico em *L-shaped* indica que também não há indícios de uma recente redução no tamanho efetivo nos *clusters* de *L. cf. friderici* Paraná. Para os três *clusters* existe uma maior quantidade de alelos na classe de frequência mais inferior.

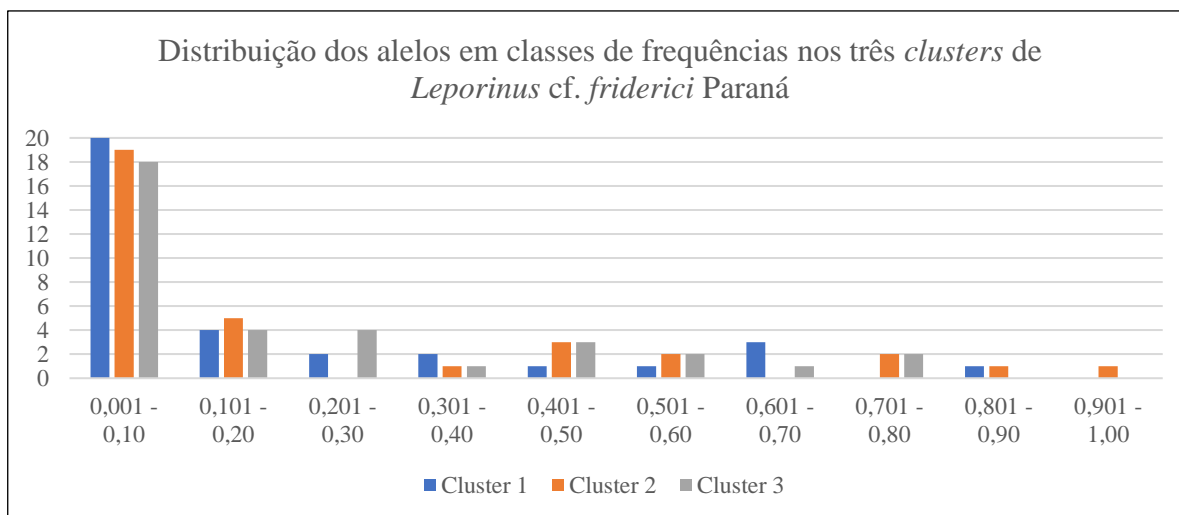


Figura 2.13 Gráfico da distribuição dos alelos em classes de frequências dos *clusters* de *Leporinus cf. friderici* Paraná.

2.4.2 *Megaleporinus obtusidens*

2.4.2.1 Marcador mitocondrial D-loop

Um total de 74 sequências, com comprimento de 982 pb, foi obtido para a região controle do DNA mitocondrial na espécie *M. obtusidens*. O número de indivíduos sequenciados por cada ponto amostral é mostrado na tabela 2.2.

Os resultados da análise de BAPS com informação *a priori* dos rios amostrados, indicaram que na bacia do alto rio Paraná existe apenas um grupo genético de *M. obtusidens* (Figura 2.14). O $K = 1$ obteve valores de $\log(\text{ml}) = -249,1833$ e de probabilidade posterior de 0,99. O segundo melhor valor de $\log(\text{ml}) = -254,3778$ para $K = 2$.

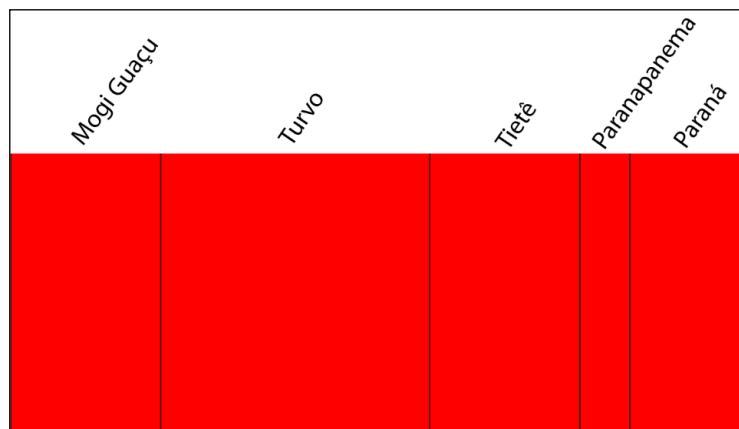


Figura 2.14 Análise de *clusterização* por Inferência Bayesiana realizada no BAPS para as sequências D-loop de *Megaleporinus obtusidens* a nível de *Clustering of groups of individuals*. Nesse *output* cada indivíduo é representado por uma barra vertical e os possíveis grupos genéticos assumem cores diferenciadas. Aqui, todos os indivíduos pertencem ao mesmo grupo genético configurado na cor vermelha.

Os valores de F_{st} par a par entre as bacias amostradas foram significativos para as comparações entre os rios Mogi Guaçu e Tietê e os rios Turvo e Tietê, ao quais apresentaram os respectivos valores de $F_{st} = 0,13$ ($p = 0,00000$) e $F_{st} = 0,11$ ($p = 0,00901$) (Tabela 2.10). Entre os rios Turvo e Paranapanema o valor de F_{st} foi igual a 0,1189, com valor de p pouco significativo ($p = 0,05405$).

Tabela 2.10 Valores de F_{st} entre os pares de sub-bacias amostrados para a espécie *Megaleporinus obtusidens* com os dados de D-loop. *Valores significativos no nível de significância $p < 0,05$ em 10.000 permutações.

Sub-bacias	Mogi Guaçu	Turvo	Tietê	Paranapanema
Turvo	0,00000			
Tietê	0,13914*	0,11921*		
Paranapanema	0,09131	0,11890	0,04878	
Paraná	0,03528	0,02306	0,02374	0,00000

Foi identificado um total de dezoito haplótipos (Tabela S2.5), sendo apenas um (H2) deles compartilhado entre todos os rios amostrados. Com relação aos haplótipos exclusivos, seis, estão presentes no rio Mogi Guaçu (H1, H3 e H5 ao H8), dois no rio

Turvo (H11 e H12), quatro no rio Paraná (H15 ao H18) e um no rio Paranapanema (H14). A relação entre os haplótipos é apresentada na figura 2.15.

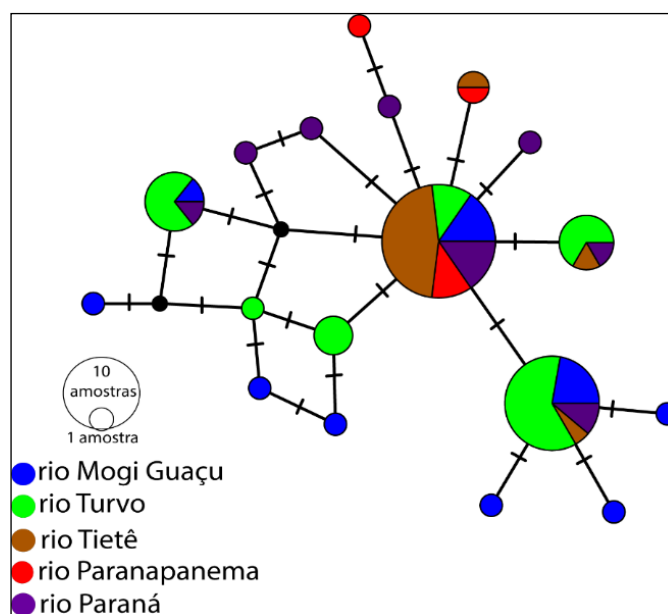


Figura 2.15 Rede de haplótipos construída com os dados de seqüências de D-loop para a espécie *Megaleporinus obtusidens* a partir do método de *Median-Joining*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. Os traços representam o número de mutações presentes entre os haplótipos. Os círculos em preto representam haplótipos não amostrados que foram inferidos pela análise (“mediam vectors”). As cores indicam os rios de coleta detalhados na legenda.

Com relação à diversidade genética, a diversidade haplotípica média total foi $H_d = 0,808$. Entretanto, ao analisarmos separadamente os rios amostrados, os valores de diversidade haplotípica foram: $H_d = 0,371$ para o rio Tietê e $H_d = 0,894$ para o rio Paraná. A diversidade nucleotídica π variou de 0,094% a 0,282%. Os resultados obtidos para os índices de diversidade estimados para cada rio amostrado são mostrados na tabela 2.11.

Tabela 2.11 Índices de diversidade genética calculados para a espécie *Megaleporinus obtusidens* com os dados de D-loop.

Sub-bacias	N	H	k	S	Hd	π (%)
Mogi Guaçu	15	9	2,248	9	0,888	0,282
Turvo	27	6	1,698	5	0,781	0,173
Tietê	15	4	0,400	3	0,371	0,094
Parapanema	5	3	1,200	3	0,700	0,122
Paraná	12	7	1,576	7	0,894	0,160
Total	74	18	1,564	15	0,808	0,159

N = número de indivíduos, h = número de haplótipos, k = número médio de diferenças nucleotídicas, S = número de sítios polimórficos, Hd = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica.

Os testes de neutralidade realizados com as 74 sequências de *M. obtusidens*, apresentaram valores negativos e significativos, sendo os valores do D de Tajima $D = -1,41887$ ($p = 0,037$) e o de Fs de $F_u = -11,905$ ($p = 0,00$). Esses resultados apontam para a existência de uma possível expansão populacional. A curva de distribuição das diferenças par a par entre os pares de sequências da análise MD apresentou um formato unimodal (Figura 2.16), indicando também uma expansão populacional. Entretanto, quando calculados os índices de ajuste entre as duas curvas, o índice SSD (0,00081237) não apresentou valor significativo ($p = 0,464$), não rejeitando a hipótese de expansão populacional, enquanto que o índice r (0,05035254) apresentou um valor significativo ($p = 0,003$), rejeitando a hipótese de expansão populacional.

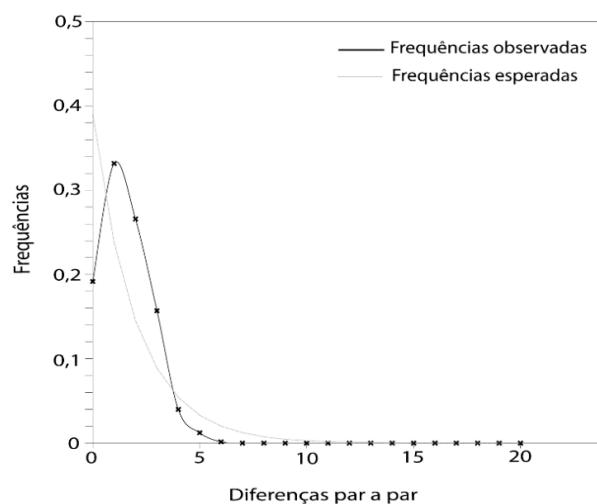


Figura 2.16 Análise de *Mismatch Distribution* para as 74 sequências D-loop de *Megaleporinus obtusidens*. O gráfico representa a distribuição da frequência do número de diferenças entre os pares de sequências (SSD = 0,00081237, $p = 0,464$; índice de Raggedness $r = 0,05035254$, $p = 0,003$).

O modelo evolutivo selecionado para as sequências D-loop de *M. obtusidens* e utilizado na análise BSP foi o HKY+I. O resultado dessa análise indica que *M. obtusidens* vem passando por um aumento no tamanho efetivo populacional ao longo do tempo, sendo esse aumento mais acentuado nos últimos quinze mil anos (Figura 2.17).

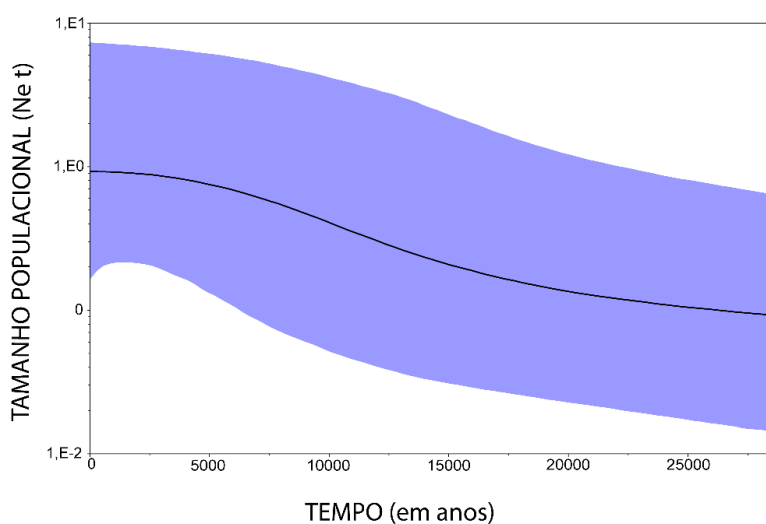


Figura 2.17 Análise de *Bayesian Skyline Plot* mostrando o tamanho populacional ao longo do tempo da espécie *Megaleporinus obtusidens*. O eixo X representa o tempo no presente em anos enquanto que o eixo Y traz a informação do produto do tamanho efetivo populacional (N_e) e

tempo de geração por milhão de ano (t) em uma escala log. A linha preta sólida indica a estimativa média e a área em azul o intervalo de maior densidade posterior (95%).

2.4.2.2 Marcadores microsatélites

2.4.2.2.1 Estruturação populacional

Do total de 12 marcadores de microsatélites testado, onze apresentaram padrão de amplificação satisfatório na espécie *M. obtusidens*. Como quatro locos haviam sido previamente prospectados para outras espécies da família Anostomidae, os produtos de sua amplificação foram também sequenciados. Os resultados do sequenciamento das regiões amplificadas mostraram os *motifs* de repetição de microsatélites iguais aos inicialmente prospectados para *M. macrocephalus* (Lmac 05, Lmac 06, Lmac 07 e Lmac 08), confirmando a existência dos mesmos locos de microsatélites também na espécie *M. obtusidens* (Tabela S2.1).

As análises de *clusterização* foram realizadas com 121 indivíduos e onze locos. O resultado da análise de DAPC para encontrar o valor ótimo do número de *clusters* na nossa amostragem foi $K = 3$. A figura 2.18 mostra os gráficos contendo os resultados de melhor K e o dos três *clusters* genéticos resultantes. O *cluster* 1 é composto 26 indivíduos, o *cluster* 2 por 52 indivíduos e o *cluster* 3 por 43 indivíduos.

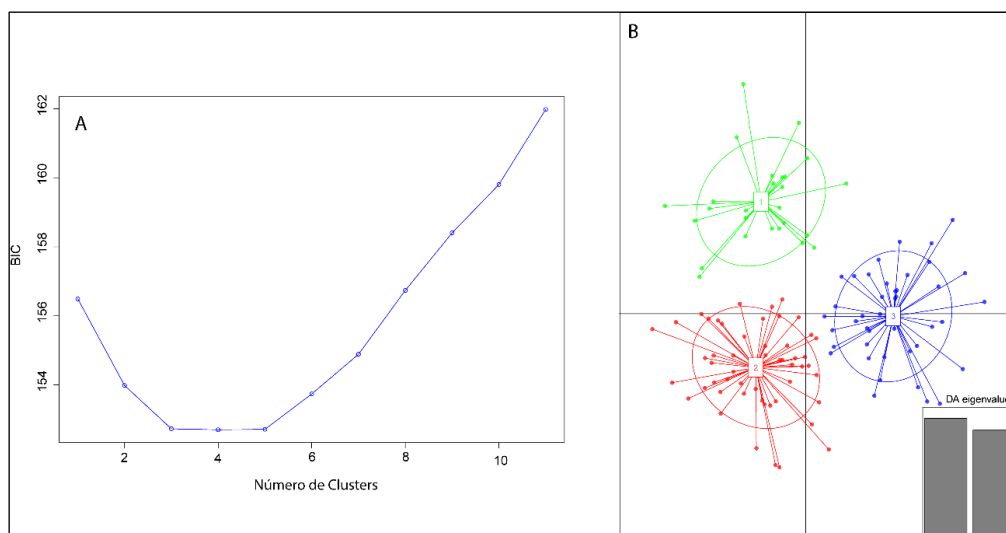


Figura 2.18 Análise de DAPC para a espécie *Megaleporinus obtusidens*. **A)** valores de Critério de Informação Bayesiana (BIC) a partir de diferentes valores K usando os primeiros 20 componentes principais. O valor de K ideal é aquele que apresenta o menor valor de BIC ($K = 3$).

B) Gráfico representando os indivíduos como os pontos e os *clusters* como as elipses. Cada *cluster* assume uma cor: *cluster 1* em verde, *cluster 2* em vermelho e *cluster 3* em azul.

Assim como para *Leporinus cf. friderici* Paraná, os diferentes rios amostrados tiveram representantes nos três *clusters* encontrados na análise de DAPC. O *cluster 3* está constituído majoritariamente por indivíduos do rio Mogi Guaçu, enquanto que nos outros *clusters* há um balanço maior na distribuição da quantidade de indivíduos dos diferentes rios. A figura 2.19 traz informações a respeito da quantidade de indivíduos por rio amostrado (A) e da probabilidade de associação desses indivíduos nos seus respectivos *clusters* (B).

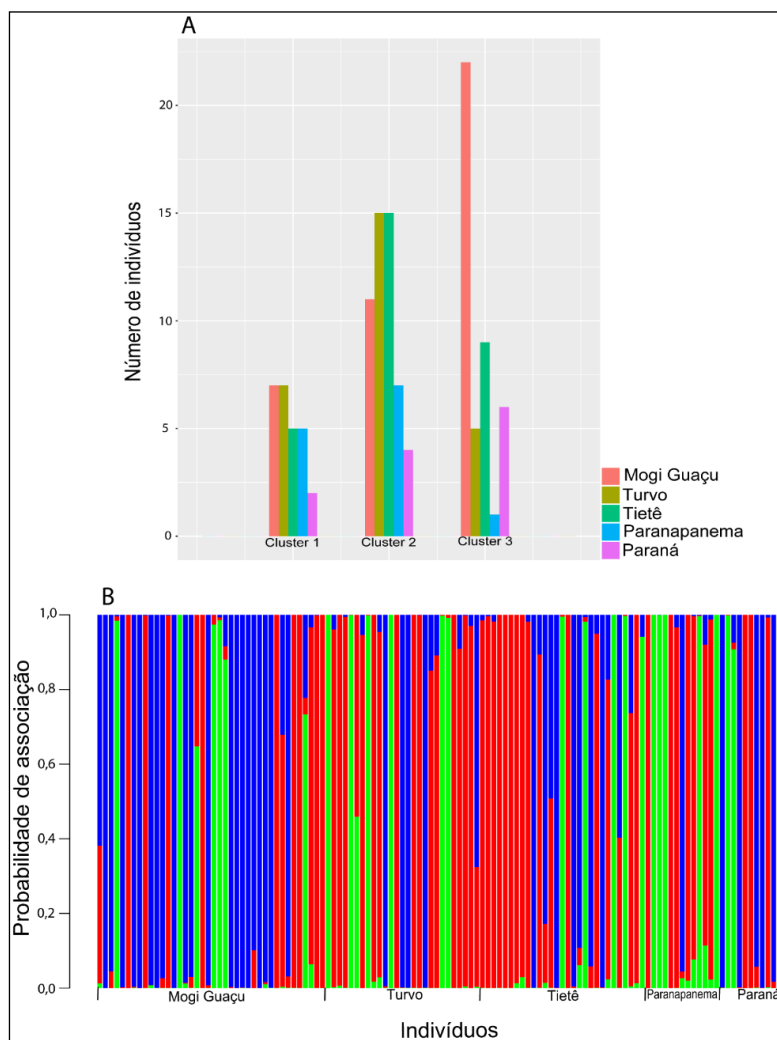


Figura 2.19 A) Gráfico de barras informando a quantidade de indivíduos de *Megaleporinus obtusidens* por rio amostrado pertencente a cada *cluster*. B) Gráfico de barras indicando a probabilidade de pertencimento de cada indivíduo a cada *cluster*. Cada barra representa um

indivíduo e as cores são referentes aos *cluster* 1 em verde, *cluster* 2 em vermelho e *cluster* 3 em azul.

Com relação as análises conduzidas no programa STRUCTURE, sem informação *a priori* da origem dos indivíduos, o resultado do número provável de K na amostragem foi $K = 2$, após a correção de Evanno, com valor de Delta K = 4,556070. Entretanto, ao analisarmos o gráfico de probabilidade de pertencimento dos indivíduos a essas duas populações, não é possível visualizá-las de forma clara (Figura S2.3).

Os resultados da FCA, segundo os *clusters* genéticos encontrados na análise de DAPC, indica que são necessários apenas dois fatores principais para que 100% da distribuição dos indivíduos no espaço fatorial seja explicada (Figura 2.20).

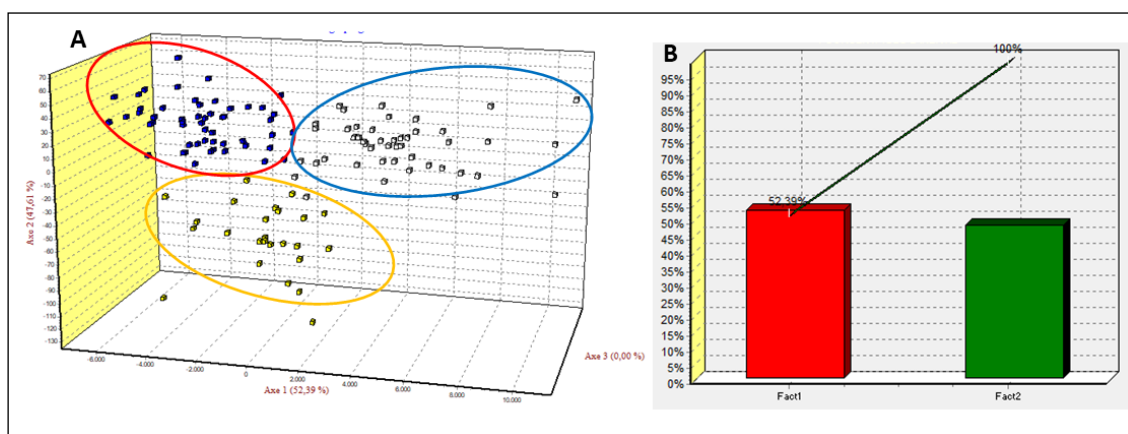


Figura 2.20 A) Análise de correspondência fatorial (FCA) para os indivíduos amostrados, segundo os *clusters* genéticos encontrados na análise de DAPC para a espécie *Megaleporinus obtusidens*. Os indivíduos pertencentes ao *cluster* 1 estão dentro da elipse amarela; os indivíduos pertencentes ao *cluster* 2 estão dentro da elipse vermelha e os indivíduos pertencentes ao *cluster* 3 estão dentro da elipse azul. B) Gráfico de barras indicando a porcentagem de contribuição de cada fator para a distribuição dos indivíduos no espaço fatorial. O fator 1 contribuiu com aproximadamente 52,4% e o fator 2 com 47,6%.

2.4.2.2.2 Diversidade genética

O resultado da análise no MICRO-CHECKER com relação à presença de alelos nulos, indicou que ao se reunir toda a amostragem, os locos Lobt 01, Lobt 08, Lobt 09, Lmac 06, Lmac 08, Lolar 8 e Lolar 15 evidenciaram a existência de alelos nulos. Quando

essa análise é feita por bacia de coleta, os locos que acusam a presença de alelos nulos são diferentes entre as diferentes bacias, exceto pelo loco Lobt 09 que também apresenta alelos nulos nos três *clusters* resultantes da análise de DAPC. Portanto, o loco Lobt 09 foi retirado das análises a seguir.

Os valores de diferenciação F_{st} e de D_{est} par a par, entre as bacias amostradas, se apresentaram significativos para a maior parte das comparações, com valores variando entre $0,02153 < F_{st} < 0,03415$ e $0,059105 < D_{est} < 0,127183$ (Tabela 2.12). Quando esses mesmos índices foram calculados entre os pares de *clusters* obtidos na análise de DAPC, todas as comparações foram significativas com valores iguais a $0,06937 < F_{st} < 0,08121$ e $0,122359 < D_{est} < 0,192069$ (Tabela 2.13).

Tabela 2.12 Valores de F_{st} (diagonal abaixo) e D_{est} (diagonal acima) entre os pares de sub-bacias amostradas para a espécie *Megaleporinus obtusidens* utilizando os dados de microssatélites. Valores de D_{est} segundo a correção de Bonferroni.

Sub-bacias	Mogi Guaçu (pontos 1 e 4)	Mogi Guaçu (pontos 2 e 3)	Turvo	Tietê	Parapanema	Paraná
Mogi Guaçu (pontos 1 e 4)		0,095688*	0,075813*	0,030679	0,118135*	0,112363*
Mogi Guaçu (pontos 2 e 3)	0,01279		0,076928*	0,127183*	0,109723*	0,059105
Turvo	0,00949	0,01308		0,092519*	0,102077*	0,081796*
Tietê	0,00678	0,02449*	0,01422*		0,037303	0,086578*
Parapanema	0,02847*	0,03415*	0,02639*	0,00877		0,093139
Paraná	0,01787	0,01705	0,03792*	0,02153*	0,03384*	

*Valores significativos para $p < 0,05$. Valores calculados a partir de 10.000 permutações.

Tabela 2.13 Valores de F_{st} (diagonal abaixo) e D_{est} (diagonal acima) entre os *clusters* genéticos da espécie *Megaleporinus obtusidens* utilizando os dados de microssatélites. Valores de D_{est} segundo a correção de Bonferroni.

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
Cluster 1		0,165730*	0,192069*
Cluster 2	0,08121*		0,122359*
Cluster 3	0,06937*	0,07714*	

*Valores significativos para $p < 0,05$. Valores calculados a partir de 10.000 permutações.

Os parâmetros genéticos calculados para os 10 locos em *M. obtusidens*, indicaram que dois pares de comparações apresentaram valores significativos de p para a análise de desequilíbrio de ligação, Lobt 08 e Lobt 06 ($p = 0,014$) e Lobt 08 com Lolar 8 ($p = 0,045$). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou entre 0,394 (Lmac 05) e 0,934 (Lmac 08) com um total de 130 alelos para todo o conjunto de indivíduos analisados. O número de alelos por loco variou de quatro (Lmac05) a trinta e três (Lmac 08). Os locos Lobt 01, Lobt 08, Lmac 06, Lmac 08, Lolar 8 e Lolar 15 apresentaram valores de p significativos para o desvio do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Esses mesmos locos apresentaram valores positivos e significativos de Fis. Os valores médios de H_o , H_e e R_a foram 0,594, 0,715 e 0,6798, respectivamente. A tabela 2.14 mostra todos os resultados dos parâmetros de diversidade genética para cada loco.

Quando fazemos uma análise dos parâmetros genéticos dos indivíduos por sub-bacia amostrada, temos que os valores das heterozigosidade esperada e observada não variaram muito entre si, sendo $H_o = 0,548$ a $0,679$ e $H_e = 0,667$ a $0,715$, respectivamente. A sub-bacia do rio Turvo apresentou o maior valor de riqueza alélica, $R_a = 6,573$. Com relação aos valores de p para os desvios do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, nenhum loco se mostrou fora do equilíbrio nas amostragens das sub-bacias aqui estudadas. Valores médios positivos e significativos de Fis foram encontrados em todas as sub-bacias, exceto na amostragem do rio Mogi Guaçu mais recente (pontos 2 e 3). As amostras dos pontos 1 e 4 da sub-bacia do rio Mogi Guaçu apresentaram oito alelos privados, com frequências de 2% a 6,3%, enquanto que as amostras dos pontos 2 e 3 evidenciaram apenas dois alelos privados, com frequência de 3,6%. No rio Turvo e Tietê foram encontrados onze alelos privados, com frequências inferiores à 5%. Nos rios Paranapanema e Paraná foram encontrados dois e cinco alelos privados, respectivamente, também com frequências inferiores à 5%.

O sumário dos parâmetros genéticos em cada bacia amostrada, por loco analisado, pode ser visualizado na tabela S2.6. A figura 2.21 mostra um gráfico indicando os valores médios dos índices de diversidade genética dentro de cada sub-bacia amostrada.

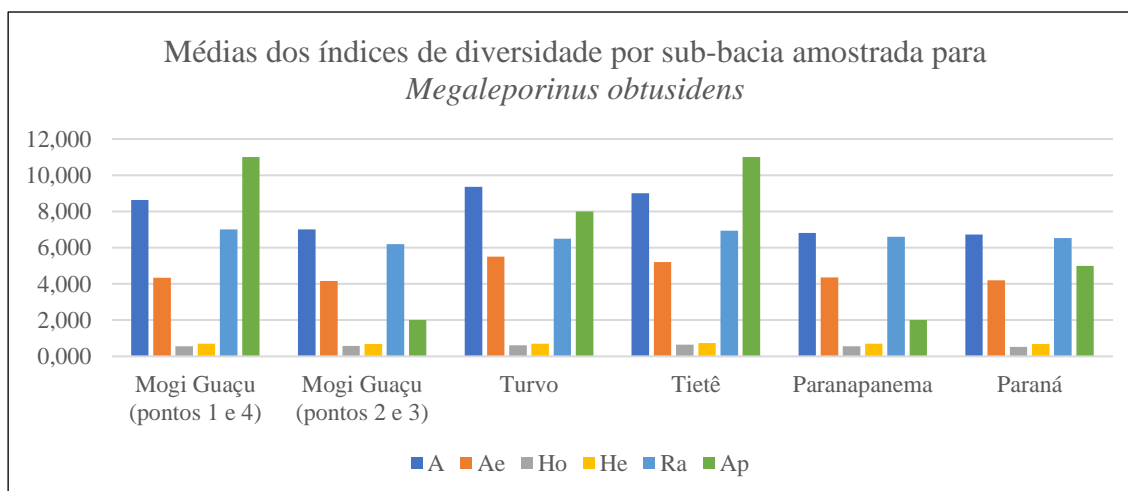


Figura 2.21 Gráfico das médias dos índices de diversidade genética por sub-bacia amostrada para a espécie *Megaleporinus obtusidens*. (A) número de alelos, (Ae) número de alelos efetivos, (Ho) heteroziguidade observada, (He) heteroziguidade esperada, (Ra) riqueza alélica e (Ap) alelos privados.

Ao analisarmos os parâmetros genéticos dentro dos *clusters* observamos os valores de $Ho = 0,562$ à $0,688$ e de $He = 0,635$ à $0,705$. O maior valor médio de Ra foi para o *cluster* 1, $Ra = 8,624$. Dentro do *cluster* 1 foram detectados 10 alelos privados, 13 no *cluster* 2 e 16 no *cluster* 3, com frequência de no máximo 6,8%. O loco Lmac 08 apresentou valores de Fis positivos e significativos nos três *clusters* evidenciados. Todos os parâmetros de diversidade genética para cada loco dentro dos *clusters* são mostrados na tabela 2.15.

Tabela 2.14 Parâmetros de variação genética para a espécie *Megaleporinus obtusidens*, baseados em dez locos de microssatélites.

	Lobt 01	Lobt 06	Lobt 08	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lolar 5	Lolar 8	Lolar 15	Média
N	117	119	117	121	105	119	117	115	107	118	115,5
A	7	8	12	4	22	10	33	10	12	12	13
Ae	4,403	2,926	7,316	1,974	6,747	4,632	15,973	3,013	2,643	1,881	5,151
Ho	0,598	0,613	0,675	0,545	0,648	0,790	0,598	0,617	0,495	0,364	0,594
He	0,776	0,661	0,867	0,495	0,856	0,787	0,941	0,671	0,625	0,470	0,7150
Fis	0,230*	0,072	0,222*	-0,102	0,244*	-0,003	0,365*	0,080	0,208*	0,226*	0,169*
P _L	0,0050	0,1000	0,0050	0,9200	0,0050	0,5800	0,0050	0,1100	0,0050	0,0050	0,0050
P _S	1,000	0,9300	1,000	0,1250	1,000	0,5350	1,000	0,9250	1,000	1,000	1,000
Ra	7,000	7,879	11,886	3,868	22,000	9,647	32,331	9,732	11,981	11,655	12,797
PIC	0,740	0,608	0,848	0,394	0,837	0,760	0,934	0,620	0,603	0,455	0,6798

N = número de indivíduos analisados, A = número de alelos, Ae = número de alelos efetivos, Ho = heterozigosidade observada, He = Heterozigosidade esperada, Fis = coeficiente de endocruzamento, P_L = p Larger, P_S = p Smaller, Ra = riqueza alélica e PIC = conteúdo de informação polimórfica. O nível de significância dos valores de Fis para o $p < 0,005$. *Valores significativos (nível de significância $p < 0,05$).

Tabela 2.15 Parâmetros de variação genética para a espécie *Megaleporinus obtusidens*, baseados nos *clusters* obtidos na análise de DAPC.

Cluster 1											
	Lobt 01	Lobt 06	Lobt 08	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lolar 5	Lolar 8	Lolar 15	Média
N	24	25	26	26	22	26	26	26	23	25	24,9
A	7	6	9	3	12	7	23	6	9	7	8,9
Ae	2,624	3,369	5,540	1,726	5,407	5,281	15,191	2,793	5,781	1,874	4,959
Ho	0,583	0,84	0,769	0,538	0,727	0,884	0,730	0,538	0,869	0,4	0,688
He	0,618	0,703	0,819	0,420	0,815	0,810	0,934	0,642	0,827	0,466	0,705
Fis	0,079	-0,175	0,081	-0,261	0,131	-0,072	0,236*	0,180	-0,029	0,162	0,046
P _L	0,3233	0,9700	0,2600	0,9400	0,1150	0,8967	0,0017	0,1233	0,7367	0,1350	0,0983
P _s	0,8500	0,0917	0,8750	0,0967	0,9683	0,2917	1,000	0,9467	0,5050	0,9617	0,9033
P _{EHW}	0,1776	0,1167	0,0334*	0,0429*	0,0100*	0,1042	0,0006*	0,1748	0,0000*	0,0520*	-
Ra	6,828	5,974	8,801	2,846	12,000	6,979	21,327	5,692	8,956	6,842	8,624
Cluster 2											
	Lobt 01	Lobt 06	Lobt 08	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lolar 5	Lolar 8	Lolar 15	Média
N	52	51	49	52	47	52	50	49	46	52	50
A	7	5	9	3	17	8	23	7	11	5	9,5
Ae	4,215	1,588	7,264	1,805	4,908	4,185	14,005	2,581	2,610	1,244	4,441
Ho	0,615	0,411	0,673	0,615	0,680	0,788	0,56	0,693	0,413	0,173	0,562
He	0,762	0,370	0,862	0,446	0,796	0,761	0,928	0,612	0,616	0,196	0,635
Fis	0,203	-0,102	0,229*	-0,371	0,155	-0,026	0,405*	-0,122	0,340*	0,130	0,125*
P _L	0,0050	0,9417	0,0017	0,9983	0,0133	0,6950	0,0017	0,9233	0,0017	0,1517	0,0017
P _s	0,9983	0,2150	1,000	0,0067	0,9967	0,4217	1,000	0,1467	1,000	0,9600	1,000
P _{EHW}	0,0017*	0,9460	0,0066*	0,0122*	0,0013*	0,0471*	0,0000*	0,4655	0,0000*	0,0721	-
Ra	6,336	4,376	8,806	2,423	12,279	7,189	17,866	5,914	8,930	3,845	7,796
Cluster 3											
	Lobt 01	Lobt 06	Lobt 08	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lolar 5	Lolar 8	Lolar 15	Média

N	41	43	42	43	36	41	41	40	38	41	40,6
A	7	8	11	4	14	9	22	9	6	11	10,1
Ae	4,110	3,196	6,368	1,669	7,120	3,531	115,532	3,611	1,656	3,476	4,629
Ho	0,585	0,720	0,619	0,465	0,555	0,731	0,560	0,575	0,368	0,585	0,576
He	0,756	0,687	0,842	0,401	0,859	0,716	0,913	0,723	0,396	0,712	0,700
Fis	0,238	-0,037	0,277*	-0,148	0,366*	-0,008	0,396*	0,217	0,084	0,190	0,189*
P _L	0,0050	0,7333	0,0017	0,9433	0,0017	0,6267	0,0017	0,0150	0,2917	0,0117	0,0017
P _s	1,000	0,4333	1,000	0,1900	1,000	0,5833	1,000	1,000	0,8667	0,9983	1,000
P _{EHW}	0,0031*	0,1142	0,0005*	0,6849	0,0000*	0,8620	0,0000*	0,0018*	0,0020*	0,0062	-
Ra	6,573	6,411	9,718	3,399	11,472	7,489	17,649	7,214	4,956	9,478	8,435

N = número de indivíduos analisados, A = número de alelos, Ae = número de alelos efetivos, Ho = heterozigosidade observada, He = Heterozigosidade esperada, Fis = coeficiente de endocruzamento, P_L = p Larger, P_s = p Smaller, P_{EHW} = valores de p para os desvios do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, Ra = riqueza alélica e PIC = conteúdo de informação polimórfica. O nível de significância dos valores de Fis para o $p < 0,00167$. * Valores significativos (nível de significância $p < 0,05$). ** Valores significativos após correção de Bonferroni.

2.4.2.2.3 Aspectos demográficos recentes

A figura S2.4 mostra o gráfico da distribuição das frequências alélicas por loco analisado em *M. obtusidens*. Segundo esse gráfico, os locos Lobt 01, Lobt 06, Lobt 08, Lmac 06, Lmac 07, Lmac 08 e Lolar 5 apresentam frequências alélicas com comportamento atribuído ao modelo SMM. Já os locos Lmac 05, Lolar 8 e Lolar 15 evidenciaram frequências alélicas de comportamento atribuído aqueles locos que estão sob o modelo IAM. Portanto, o modelo evolutivo selecionado na análise de *Bottleneck* foi o modelo TPM.

Os valores de p da análise de *Bottleneck* indicam resultados não significativos para a ocorrência de um gargalo populacional em *M. obtusidens* no que tange ao excesso de heterozigidade nos três *clusters* analisados sob o modelo evolutivo escolhido (Tabela 2.16).

Tabela 2.16 Valores de p para a análise de *Bottleneck* nos *clusters* de *Megaleporinus obtusidens*, segundo os diferentes modelos de mutações. IAM (Alelos Infinitos), SMM (*Stepwise Mutation*) e TPM (*Two Phase Mutation*). *Valores significativos $p < 0,05$.

<i>Cluster 1</i>	Teste Wilcoxon		
	IAM	SMM	TPM
Déficit de heterozigidade	0,90332	0,00928*	0,04199*
Excesso de heterozigidade	0,11621	0,99316	0,98389
Déficit e excesso de heterozigidade	0,23242	0,01855*	0,08398
<i>Cluster 2</i>	IAM	SMM	TPM
Déficit de heterozigidade	0,46094	0,00928*	0,06543*
Excesso de heterozigidade	0,57715	0,99316	0,94727
Déficit e excesso de heterozigidade	0,92188	0,01855*	0,13086
<i>Cluster 3</i>	IAM	SMM	TPM
Déficit de heterozigidade	0,75391	0,00049*	0,00244*
Excesso de heterozigidade	0,27832	1,000	0,99854
Déficit e excesso de heterozigidade	0,55664	0,00098*	0,00488*

A figura 2.22 mostra um gráfico com a distribuição das frequências alélicas em classes de frequências. Esse gráfico indica que, segundo essa análise também não há indícios de uma recente redução no tamanho efetivo dos *clusters* de *M. obtusidens*. Para os três *clusters* existe uma maior quantidade de alelos na classe de frequência mais inferior, fazendo com que o gráfico assumira uma configuração *L-shaped*.

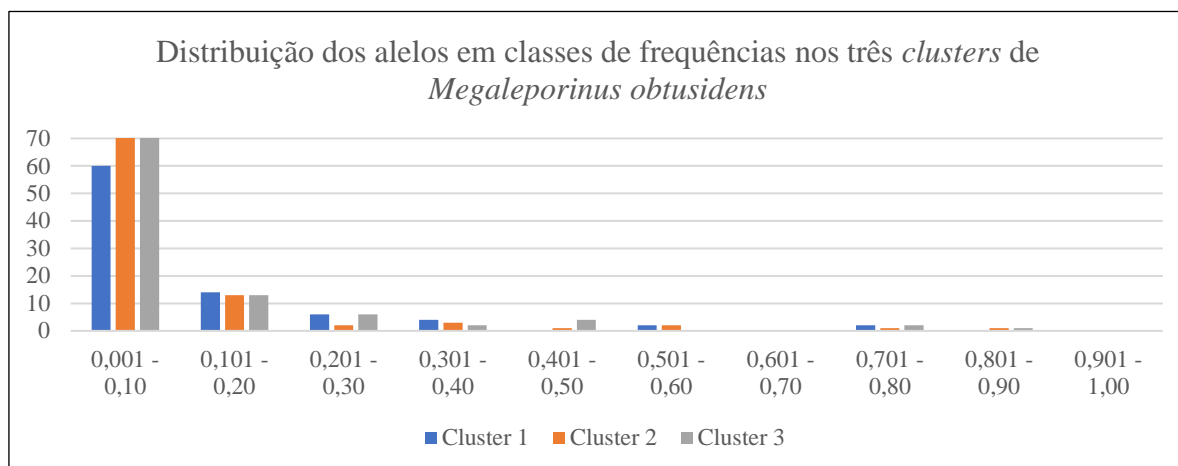


Figura 2.22 Gráfico de distribuição dos alelos em classes de frequências dos *clusters* de *Megaleporinus obtusidens*.

2.5 Discussão

2.5.1 Marcador mitocondrial D-loop

Os resultados das análises de estrutura populacional, realizadas com os dados da região D-loop, indicaram que para as espécies *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens* não existe subestruturação dentro da bacia do alto rio Paraná. A ausência de estruturação genética com um marcador histórico também já foi observada em outra espécie migradora na bacia do alto rio Paraná, como por exemplo em *Prochilodus lineatus* (SIVASUNDAR et al., 2001; GARCEZ et al., 2011; FERREIRA et al., 2017), e também em *Leporinus elongatus* (MARTINS et al., 2003), citada aqui como *M. obtusidens*, de acordo com Birindelli et al. (2013) e Ramirez et al. (2017).

Apesar de *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens* constituírem uma única população histórica no alto rio Paraná, nós encontramos haplótipos exclusivos dentro das sub-bacias para ambas as espécies. A existência desses haplótipos sugere uma sutil diferenciação genética entre essas sub-bacias, devido possivelmente a uma redução no fluxo gênico entre elas. Silva et al. (2015), ao avaliarem a estrutura genética de *Salminus hilarii* nas sub-bacias dos rios Tietê, Grande e Paranapanema, observaram que a maior parte dos haplótipos exclusivos de D-loop ocorreu dentro de cada sub-bacia, atribuindo a este fato a existência de fluxo gênico reduzido dentro da bacia do alto rio Paraná. Martins et al. (2003), apesar de não terem estimado índices de estruturação (F_{st}) entre as sub-

bacias, não encontraram haplótipos compartilhados entre os rios Mogi Guaçu, Grande, Tietê, Paraná e Paranapanema, sugerindo, portanto, uma diferenciação entre eles.

Os valores de F_{st} obtidos para ambas as espécies sugerem uma sutil subestruturação para algumas sub-bacias analisadas. Para a espécie *L. cf. friderici* Paraná, foram encontrados valores de F_{st} considerados altos ($0,15 < F_{st} < 0,25$, WRIGHT, 1965), sendo estes significativos entre os rios Mogi Guaçu e Grande ($F_{st} = 0,1548$), Tietê e Grande ($F_{st} = 0,2217$), Tietê e Verdinho ($F_{st} = 0,1817$) e Tietê e Claro ($F_{st} = 0,2081$); valores considerados moderados ($0,05 < F_{st} < 0,15$, WRIGHT, 1965) foram encontrados entre os rios Mogi Guaçu e Paraná ($F_{st} = 0,0681$) e os rios Tietê e Paraná ($F_{st} = 0,1256$). Para *M. obtusidens* valores de estruturação moderados e significativos também foram encontrados entre os rios Mogi Guaçu e Tietê ($F_{st} = 0,1391$) e os rios Turvo e Tietê ($F_{st} = 0,1192$). A sub-bacia do rio Mogi Guaçu é separada das demais sub-bacias do alto rio Paraná pela UHE de Marimbondo, construída em 1975. Essa UH substituiu uma antiga barreira natural existente na área, e, segundo GARCEZ et al. (2011), ela pode ter sido responsável pela estruturação observada na espécie *P. lineatus*, evidenciada por valores de F_{st} significativo ($F_{st} = 0,12$, $p < 0,05$) observado entre pontos de coleta separados pelo barramento.

O marcador mitocondrial D-loop tem sido amplamente utilizado em estudos populacionais devido sua taxa mutacional ser até 100x mais elevada que a de regiões nucleares (GALTIER et al., 2009; LUI et al., 2012). Entretanto, devemos levar em consideração que a taxa desse marcador é mais lenta que a de marcadores de microsatélites e, portanto, ainda que eficiente, permite avaliar eventos populacionais que ocorreram no passado não tão recente. Considerando tal premissa, nossos dados sugerem que, historicamente, dentro da bacia do alto rio Paraná, existiu uma única população genética para as duas espécies estudadas aqui, a qual ainda é percebida pelas análises mitocondriais. Apesar disso, a existência de haplótipos exclusivos dentro de cada sub-bacia sugere uma sutil subestruturação, resultado este possivelmente associado à redução de fluxo gênico entre estas durante períodos específicos. Embora possa existir alguma diferenciação genética dentro do alto rio Paraná, essa ser o resultado de uma subamostragem populacional nas sub-bacias não pode ser descartada.

No tocante à diversidade haplotípica, *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens* apresentaram índices $H_d > 0,5$, considerados altos por Lowe et al. (2006). *Leporinus cf. friderici* Paraná apresentou diversidade genética média maior que *M. obtusidens*. Os

valores de diversidade haplotípica encontrados aqui estão em consonância com aqueles descritos em trabalhos que utilizaram o mesmo marcador também em espécies migradoras do alto rio Paraná. Em *P. lineatus*, por exemplo, os índices médios de diversidade haplotípica foram de $Hd = 0,772$ (GARCEZ; CALCAGNOTTO; DE ALMEIDA-TOLEDO, 2011), $Hd = 0,988$ (FERREIRA et al., 2017) e $Hd = 1,00$ (SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTI, 2001). Valores similares também foram encontrados em *Brycon orbignyanus* ($Hd = 0,829$; ASHIKAGA et al., 2015), *S. hilarii* ($Hd = 0,950$; SILVA et al., 2015), *M. obtusidens* ($Hd = 0,958$; MARTINS et al., 2003).

Altos índices de diversidade genética podem ser atribuídos à natureza das espécies estudadas, peixes migradores costumam apresentar altos níveis de diversidade devido ao grande tamanho efetivo das populações e a alta taxa de migração que minimizam o efeito da deriva genética como uma força que reduz diversidade (ALLENDORF; LUIKART, 2007; SANTOS et al., 2007) e a processos demográficos, como expansões populacionais.

Com relação à diversidade nucleotídica, os valores médios observados para *L. cf. friderici* Paraná ($\pi = 0,3\%$) e *M. obtusidens* ($\pi = 0,1\%$) são considerados baixos ($\pi < 0,5\%$), segundo Ferreira et al. (2016), principalmente quando os comparamos a dados obtidos para outras 21 espécies de peixes neotropicais ($\pi = 1,5\%$) (HILSDORF, 2013); e 12 espécies do hemisfério Norte ($\pi = 2,7\%$) (BILLINGTON; HEBERT, 1991), todas continentais. Este resultado sugere que as populações aqui analisadas possuem uma origem mais recente, uma vez que estas possuem valores baixos de π . Pois, populações com história antiga tendem a apresentar muitas substituições entre os haplótipos (HILSDORF, 2013).

A diversidade nucleotídica baseada em dados moleculares mensura o número médio de diferenças nucleotídicas por sítio, entre sequências do DNA, as quais podem ser utilizadas para comparar indivíduos e populações. Tais informações são úteis não somente para inferir sobre o relacionamento entre populações, mas também sobre eventos que refletem mudanças nos seus tamanhos populacionais (ASMUSSEN; ARNOLD; AVISE, 1987). As expansões ou contrações demográficas deixam assinaturas no padrão de diversidade molecular das populações. No caso de expansão populacional súbita, estas podem ser mensuradas pelas configurações das redes haplotípicas que podem se apresentar formato de estrela, pela verificação de distribuição unimodal das diferenças par a par entre sequências (ROGERS; HARPENDING, 1992), e pela detecção de redução no número de sítios polimórficos (TAJIMA, 1996) ou de uma grande quantidade de

mutações com baixa frequência (FU, 1997). Grant & Bowen (1998) também sugerem que altos valores de diversidade haplotípica e pequenos valores de diversidade nucleotídica indicam uma provável expansão demográfica precedida de um período de baixo tamanho efetivo populacional. Os nossos dados confirmam todos estes cenários para as duas espécies.

As configurações das redes haplotípicas de *L. cf. friderici* Paraná e de *M. obtusidens* sugerem uma expansão populacional a partir da existência de haplótipos centrais mais frequentes, conectados a haplótipos periféricos e menos frequentes (TEMPLETON et al., 1995). Os dois testes de neutralidade (D de Tajima e F_s de Fu) realizados também indicaram expansão populacional para ambas espécies, com exceção do teste D de Tajima que em *L. cf. friderici* Paraná, evidenciou um valor de p não significativo. Os gráficos da análise de *Mismatch Distribution* também apresentaram um padrão unimodal (característico de expansão populacional), apesar da baixa significância do índice SSD ($p = 0,011$) em *L. cf. friderici* Paraná e do índice r ($p = 0,003$) em *M. obtusidens*. Os estimadores bayesianos de processos demográficos também sugeriram que as duas espécies têm experimentado um crescimento populacional paulatino (gradual e progressivo) nos últimos cinquenta mil anos. Esse padrão também foi observado em outras espécies migradoras do alto rio Paraná como *B. orbignyianus* (ASHIKAGA et al., 2015), *P. lineatus* (GARCEZ et al., 2011) e *S. hilarii* (SILVA et al., 2015).

Os resultados das análises demográficas podem ser associados aos eventos históricos ocorridos na bacia do alto rio Paraná. Análises de dados palinológicos, de sedimentologia e geomorfologia nas sub-bacias sugerem que essa bacia experimentou oscilações hídricas por consideráveis períodos durante o Pleistoceno-Holoceno (ALBERT; REIS, 2011; SALLUN; SUGUIO, 2010; SANTOS; STEVAUX, 2000; STEVAUX; SOUZA, 2004). Períodos de seca podem ter isolado algumas sub-bacias que foram reconectadas em períodos de inundação. Dados de DNAmT em *Hypostomus ancistroides* das sub-bacias do alto rio Paraná revelaram a existência de diferentes linhagens amplamente distribuídas ao longo dessa bacia (CARVALHO et al., 2015). Para esses autores os períodos de seca duraram tempo suficiente para que essas linhagens se diferenciasssem e posteriormente fossem misturadas durante os períodos de inundação e contato desses rios. Mondin et al. (2018), ao analisar populações de *S. brasiliensis* no alto rio Paraguai, encontraram expansão populacional acentuada há aproximadamente 60 mil anos, sendo essa associada às oscilações climáticas ocorridas durante os períodos

interglaciais do Pleistoceno. Nossos dados genéticos também se relacionam com eventos que ocorreram ao longo da história da bacia do alto rio Paraná durante o Pleistoceno. Entretanto, devemos levar em consideração que esses foram resultados obtidos para um único marcador e por este motivo podem não necessariamente refletir a história demográfica completa dessas espécies (KNOWLES; RICHARDS, 2005). Desta forma, uma análise complementar, utilizando outros marcadores de natureza similar, de outras regiões do genoma é fortemente sugerida.

2.5.2 Marcadores microssatélites

Os indivíduos de *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens* das diferentes sub-bacias agruparam-se em três *clusters* bem evidenciados (Figuras 2.9 e 2.18), indicando a ocorrência de grupos genéticos sem associação geográfica. Os valores de F_{st} e D_{est} corroboram essa estruturação pois foram significativos para todos os pares de comparações, exceto o F_{st} entre os *clusters* 2 e 3 na espécie *L. cf. friderici* Paraná.

Em relação à estruturação genética entre as sub-bacias, foram encontrados valores significativos tanto para o índice F_{st} quanto para o D_{est} . Resultados similares foram encontrados por outros autores nas espécies migradoras *Pseudoplatystoma corruscans* (PEREIRA; FORESTI; OLIVEIRA, 2009) e *B. orbignyianus* (ASHIKAGA et al., 2015) e *Piaractus mesopotamicus* (CALCAGNOTTO; DESALLE, 2009).

Diferentes mecanismos podem promover estruturação e diferenciação populacional em peixes migradores. Barreiras físicas, como por exemplo as cachoeiras, cânions e usinas hidrelétricas, podem atuar de maneira a interromper ou diminuir o fluxo gênico entre grupos de indivíduos, que com o passar do tempo podem acumular diferenças genéticas e até morfológicas (ESGUÍCERO; ARCIFA, 2011; GOUSKOV et al., 2016). Outros mecanismos que podem contribuir para a diferenciação em populações de peixes migradores dentro de uma mesma bacia hidrográfica estão relacionados a aspectos biológicos-comportamentais como o *homing*, o mecanismo de IBT (*isolation-by-time*) e o *shoaling* (RIBOLLI et al., 2018; RIBOLLI et al., 2017; BRAGA-SILVA; GALETTI JR, 2016; BATISTA; ALVES-GOMES, 2006).

O comportamento de *shoaling* (RIBOLLI et al., 2018; PITCHER, 1986) se caracteriza pela sobreposição de grupos de indivíduos geneticamente diferenciados,

durante o período não reprodutivo. Tais grupos se reúnem em um mesmo local para fins não-reprodutivos, como por exemplo, forrageamento e proteção contra predadores (DELCOURT; PONCIN, 2012; PITCHER, 1986). A segregação de populações durante o período não reprodutivo ainda é um aspecto desconhecido para muitas espécies de peixes e, muito recentemente, esse mecanismo foi sugerido pela primeira vez para a espécie de peixe continental Neotropical *S. brasiliensis* na bacia do rio Uruguai (RIBOLLI et al., 2018). Populações geneticamente diferenciadas que podem coexistir durante a época não-reprodutiva devem apresentar comportamentos reprodutivos característicos que possibilitem a manutenção de suas unidades genéticas estruturadas, baseados por exemplo no IBT. O *homing* também é uma possibilidade que favoreceria a manutenção de estoques geneticamente diferenciados durante os períodos de alimentação e crescimento.

O comportamento de *homing* ocorre quando indivíduos reprodutores realizam migração ascendente para os afluentes onde nasceram, ou seja, estes escolhem o local de nascimento para desovar (BATISTA; ALVES-GOMES, 2006). Este fenômeno pode, portanto, promover estruturação populacional, uma vez que, embora, populações distintas possam coexistir, estas se reproduziram em locais específicos, não aleatórios, possibilitando a coesão de sua estrutura genética. Um estudo realizado com a espécie *P. corruscans* nas bacias do rio Paraguai e Paraná encontrou uma diferenciação genética entre populações e sugere fortemente a utilização de regiões de nascimento para reprodução dessa espécie (PEREIRA; FORESTI; OLIVEIRA, 2009). O comportamento de *homing* também foi sugerido para *Brachyplatystoma rousseauxii*, a partir da análise de diversidade genética de populações migradoras na sub-bacia do rio Solimões, bacia Amazônica (BATISTA; ALVES-GOMES, 2006). Já no mecanismo de IBT, a reprodução não se relaciona com o local de nascimento, mas com a época em que os indivíduos de uma mesma espécie se reproduzem (HENDRY; BERG; QUINN, 1999). Assim, peixes migradores que habitam uma mesma área, se reproduzem em momentos diferentes, ainda que na mesma estação reprodutiva. Neste fenômeno ocorre uma estruturação temporal, ou seja, agrupamentos reprodutivos, geneticamente distintos, coexistem no mesmo sistema hidrográfico, mas realizam migração e desova em períodos diferentes (BRAGA-SILVA; GALETTI JR, 2016; RIBOLLI et al., 2017). Tal comportamento diminui o fluxo gênico e aumenta a diferenciação entre grupos de indivíduos que se reproduzem em períodos distintos, favorecendo assim a estruturação genética (HENDRY; BERG;

QUINN, 1999) e a coexistência de populações geneticamente distintas no período não-reprodutivo.

A existência de estoques reprodutivos geneticamente diferenciados foi documentada pela primeira vez em peixes Neotropicais na espécie *P. marggravii*, da bacia do rio São Francisco (HATANAKA; GALETTI JR., 2003). Tal padrão de estruturação populacional também foi observado em *P. argenteus* (HATANAKA; HENRIQUE-SILVA; GALETTI JR, 2006) e *P. costatus* (BRAGA-SILVA; GALETTI JR, 2016) na bacia do rio São Francisco, em *B. hilarii* da bacia do rio Paraguai (SANCHES; GALETTI JR, 2007), e em *P. lineatus* (RUEDA et al., 2013) e *S. brasiliensis* (RIBOLLI et al., 2017) da bacia do rio Uruguai.

Godoy (1975) já havia observado a ocorrência de cardumes tardios e precoces de *S. brasiliensis* na sub-bacia do rio Mogi Guaçu, reportando diferentes momentos de desova, entre meses de novembro e janeiro, para esta espécie. Entretanto, nenhum estudo genético foi realizado naquela época para uma possível associação entre mecanismos biológicos-comportamentais e padrões de distribuição da diversidade genética e estruturação populacional em peixes migradores. Portanto, é razoável sugerirmos que a estrutura populacional observada aqui em três *clusters*, tanto na espécie *L. cf. friderici* Paraná quanto *M. obtusidens*, deva ter influência de algum desses mecanismos. Para confirmação, no entanto, de quais mecanismos de fato estão atuando nessas espécies, estudos que contemplem tal abordagem devem ser realizados.

A estruturação genética aqui observada pode também ter sido propiciada pela prática de repovoamento e translocações realizados na bacia do alto rio Paraná com as espécies desse estudo (BRITTO; SIROL; VIANNA, 2003). Essas práticas quando realizadas de maneira não controlada podem misturar indivíduos de origens diferentes. Por outro lado, essa estrutura populacional não relacionada à área geográfica pode ser devida apenas ao curto período decorrido entre a implantação dessas barragens e o momento de coleta, o qual foi insuficiente para promover diferenças perceptíveis nas frequências alélicas das populações e conseqüentemente evidenciar um isolamento pela presença de barragens nessas duas espécies.

Quando analisamos a existência de desvio HW dentro das sub-bacias e dentro dos *clusters*, encontramos alguns locos que apresentaram desvios significativos do equilíbrio de HW. Uma parte desses locos também apresentou valores de Fis positivos e

significativos, indicando que a endogamia pode ser um fator que contribui para tal desequilíbrio (O'CONNELL; WRIGHT, 1997).

No geral, os valores de H_o e H_e foram maiores para a espécie *M. obtusidens* do que para *L. cf. friderici* Paraná. Entretanto, esses valores ainda são menores que aqueles descritos para muitas espécies migradoras de ocorrência nas bacias hidrográficas brasileiras (Tabela 2.17). Dentre as espécies que apresentaram resultados de H_o e H_e semelhantes aos encontrados por nós, estão *B. orbignyanus* e *Steindachneridion parahybae* que possuem o *status* em perigo, segundo a Portaria MMA 445 do Ministério do Meio Ambiente. A outra espécie é *Zungaro jahu*, que apesar de não figurar a lista de espécies ameaçadas, teve uma intensa diminuição populacional no alto rio Paraná já relatada (AGOSTINHO et al., 2003; CARRILLO-AVILA et al., 2009).

Aguiar e colaboradores (2018) discutiram o problema da baixa variabilidade genética encontrada em fazendas de cultivo de peixes que são utilizados em programas de repovoamento. Ao avaliarem as principais fazendas de cultivo de *Colossoma macropomum*, o tambaqui, os autores encontraram uma drástica redução da diversidade genética nas populações de cultivo em relação às populações naturais dessa espécie nativa brasileira, amplamente cultivada. Tal resultado foi atribuído ao pequeno tamanho das populações fundadoras e à ausência de manejo adequado da reprodução. Baixa variabilidade genética também foi encontrada em populações de cativeiro de *B. insignis* quando comparadas às populações naturais na bacia do rio Paraíba do Sul (MATSUMOTO; HILSDORF, 2009).

Segundo Agostinho et al. (2005; 2010) atividades de repovoamento vêm sendo realizadas há décadas na bacia do alto rio Paraná. Esses programas, na maioria das vezes, não levam em consideração a composição genética dos indivíduos em cativeiro e da população silvestre que irá receber os alevinos como fonte de repovoamento. Portanto, não podemos deixar de considerar que os baixos índices de diversidade genética observados nas populações desse estudo podem ser resultado de programas de repovoamento realizados com estoque de peixes com baixa variabilidade genética. Outro fator que pode estar associado à baixa variabilidade encontrada é a possível fragilidade que essas populações estão enfrentando devido às alterações antropogênicas no hábitat como a fragmentação, que reduz as populações e aumenta o efeito da deriva genética, a redução na qualidade da água e da quantidade de mata ciliar e a pesca excessiva (ASHIKAGA et al., 2015; FONSECA et al., 2017). É preciso, no entanto, salientar que

elevados valores de diversidade genética são essenciais para permitir que as populações se adaptem às alterações ambientais (ALLENDORF; RYMAN, 2002; LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005).

Tabela 2.17 Heterozigosidades médias observadas e esperadas (Ho e He) para outras espécies de peixes migradores. Com asterisco as espécies cujos índices foram semelhantes aos encontrados nesse trabalho.

Espécie	Bacia hidrográfica	Ho / He (média)	Autores
<i>Leporins cf. friderici</i> Paraná	alto rio Paraná	0,465 / 0,526	Silva-Santos, 2018
<i>Megaleporinus obtusidens</i>	alto rio Paraná	0,606 / 0,683	Silva-Santos, 2018
<i>Brycon orbignyanus</i> *	alto rio Paraná	0,350 / 0,574	Ashikaga et al., 2015
<i>Megaleporinus obtusidens</i>	alto rio Paraná	0,650 / 0,880	Ramos et al., 2012
<i>Pimelodus maculatus</i>	alto rio Paraná	0,718 / 0,851	Paiva & kalapothakis, 2008
<i>Pochilodus corruscans</i>	alto rio Paraná	0,569 / 0,708	Pereira; Foresti; Oliveira, 2009
<i>Pochilodus lineatus</i>	alto rio Paraná	0,683 / 0,834	Ferreira et al., 2017
<i>Salminus hilarii</i>	alto rio Paraná	0,946 / 0,904	Silva et al., 2015
<i>Salminus hilarii</i>	alto rio Paraná	0,663 / 0,785	Nunes, 2015
<i>Brycon insignis</i>	Paraíba do Sul	0,850 / 0,780	Matsumoto; Hilsdorf, 2009
<i>Steindachneridion parahybae</i> *	Paraíba do Sul	0,470 / 0,429	Fonseca et al., 2017
<i>Colossoma macropomum</i>	Amazônica	0,677 / 0,714	Santos; Hrbek; Farias, 2018
<i>Colossoma macropomum</i>	Amazônica	0,690 / 0,770	Aguiar et al., 2018
<i>Prochilodus nigricans</i> *	Amazônica	0,602 / 0,650	Lopes, 2018
<i>Pseudoplatystoma punctifer</i> *	Amazônica	0,514 / 0,592	Saulo-Machado et al., 2011
<i>Brycon orthotaenia</i>	São Francisco	0,683 / 0,706	Sanches et al., 2012
<i>Conorhynchos conirostris</i>	São Francisco	0,780 / 0,760	Carvalho; Beheregaray, 2018
<i>Prochilodus argenteus</i>	São Francisco	0,669 / 0,726	Barbosa et al., 2006
<i>Prochilodus argenteus</i>	São Francisco	0,821 / 0,785	Barbosa et al., 2008
<i>Prochilodus argenteus</i>	São Francisco	0,645 / 0,700	Sanches et al., 2012
<i>Pochilodus costatus</i> *	São Francisco	0,466 / 0,656	Carvalho-Costa; Hatanaka; Galetti Jr., 2008
<i>Megaleporinus macrocephalus</i> *	Paraguai	0,467 / 0,832	Morelli et al., 2007
<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> *	Paraguai	0,338 / 0,498	Abreu et al., 2009
<i>Zungaro jahu</i> *	Paraguai	0,585 / 0,659	Carrillo-Avila et al., 2009
<i>Pimelodus maculatu</i>	Uruguai	0,777 / 0,871	Ribolli; Melo; Zaniboni-Filho, 2012
<i>Prochilodus lineatus</i>	Uruguai	0,710 / 0,786	Rueda et al., 2013
<i>Salminus brasiliensis</i>	Uruguai	0,827 / 0,827	Ribolli et al., 2017
<i>Salminus brasiliensis</i>	Uruguai	0,850 / 0,844	Ribolli et al., 2018

Em locos seletivamente neutros, o número de alelos e a frequência da distribuição dos mesmos em populações naturais são resultados do equilíbrio entre mutações e deriva genética (LUIKART; CORNUET, 1998). Quando ocorre um *bottleneck* em uma população e o tamanho efetivo populacional é significativamente reduzido, acontece também uma redução entre o número de alelos e a heterozigosidade (CORNUET; LUIKART, 1996). Nossos resultados não apontam para a ocorrência de uma redução populacional recente e significativa em *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens*. A usina hidrelétrica mais antiga, dentro da nossa amostragem é a UHE Barra Bonita, no rio Tietê, inaugurada em 1964. Assumindo dois anos como a idade de maturação para as espécies (AGOSTINHO et al., 2003), são aproximadamente 25 gerações para o começo das interrupções do fluxo migratório. Para alguns autores, esse parece não ser um tempo suficiente para que os peixes migradores reflitam uma assinatura de mudanças demográficas utilizando dados moleculares (SILVA et al., 2015; CHENG et al., 2013).

Estudos anteriores com microssatélites em *P. lineatus* também não encontraram sinais de ocorrência de *bottleneck* no alto rio Paraná (FERREIRA et al., 2017). Dados de RFLP do DNAm_t tampouco os detectaram (GARCEZ et al., 2011). Por outro lado, Ashikaga et al. (2015) reportaram a ocorrência de redução populacional em *B. orbignyana* em regiões com impacto de ações antropogênicas devido à urbanização. Entretanto, estes estudos consideram pontos amostrais ou sub-bacias hidrográficas como populações genéticas, o que nem sempre ocorre. No nosso estudo, tais análises foram realizadas considerando-se os *clusters* genéticos identificados.

2.6 Considerações finais

A estrutura populacional para *L. cf. friderici* Paraná e *M. obtusidens* indicam que historicamente (DNAm_t) essas espécies apresentam uma única população genética na bacia do alto rio Paraná, embora uma subestruturação tenha sido detectada em ambas as espécies, entre algumas sub-bacias. Os dados de microssatélites não evidenciaram estruturação populacional relacionada à área geográfica ocupada pelas espécies. Apesar disso, foram detectados três *clusters* genéticos presentes em todas as sub-bacias estudadas. Esses *clusters* podem estar relacionados aos diferentes aspectos biológicos-comportamentais (*homing*, IBT e *shoaling*) e também às práticas de repovoamento e translocações não monitorados dentro da bacia.

No que concerne à diversidade genética, as duas espécies apresentam alta diversidade historicamente relacionada à biologia das espécies (comportamento migratório) e aos aspectos demográficos históricos, como expansão populacional. As análises com os dados de microssatélites mostraram índices de diversidade genética menores do que aqueles encontrados para outras espécies de peixes migradores da bacia do alto rio Paraná. Essa baixa diversidade genética pode ser um eventual reflexo negativo da realização de programas de repovoamento na região. Além disso, a perda de hábitat e a redução da migração causadas pelos barramentos são fatores que também podem contribuir para diminuição da diversidade genética das populações aqui estudadas.

Considerando que a legislação brasileira de proteção da fauna aquática tem o repovoamento como uma medida de mitigação para os impactos dos barramentos, o conhecimento gerado no presente trabalho sobre a estrutura e diversidade genética de *L. cf. friderici* e *M. obtusidens*, pode ser considerado em futuros programas que visem conservar essas espécies na bacia do alto rio Paraná.

2.7 Referências bibliográficas

ABELL, R. et al. Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. **BioScience**, v. 58, n. 5, p. 403–414, 2008.

ABREU, M. M. DE et al. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 868–873, 2009.

AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 68, p. 1119–1132, 2008.

AGOSTINHO, A. A. et al. Migratory fishes of the Paraná River Basin, Brazil. In: **Migratory fishes of South America: Biology, fisheries and conservation status**. Ottawa: The World Bank, 2003. p. 372.

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

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Algae**, v. 1, n. 1, p. 70–78, 2005.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2007.

AGOSTINHO, A. A.; VAZZOLER, A. E. A. M.; THOMAZ, S. M. The high Paraná River basin: limnological and ichthyological aspects. In: **Limnology in Brazil**. Rio de Janeiro: Brazilian Academy of Science/Brazilian Limnological Society, 1995. p. 59–104.

AGOSTINHO, C. S. et al. Selectivity of fish ladders: A bottleneck in Neotropical fish movement. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 205–213, 2007.

AGUIAR, J. DA P. et al. Loss of genetic variability in the captive stocks of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), at breeding centres in Brazil, and their divergence from wild populations. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 5, p. 1914–1925, 2018.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Los Angeles, California: University of California Press, 2011.

ALJANABI, S. 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.; LUIKART, G. H. Population subdivision. In: **Conservation and the Genetics of Populations**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007. p. 197–232.

ALLENDORF, F. W.; RYMAN, N. The role of genetics in population viability analysis. In: **Population viability analysis**. Chicago: University of Chicago Press, 2002. p. 577.

ALZUGUIR, F. Histórico da legislação referente à proteção de recursos ictícos de água doce. In: **Seminário sobre Fauna Aquática e o Setor Elétrico Brasileiro**. Rio de Janeiro: Comase/Eletróbrás, 1994. p. 19–32.

ANMARKRUD, J. A. et al. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasmy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, 2008.

ARAYA, P. R.; AGOSTINHO, A. A.; BECHARA, J. A. The influence of dam construction on a population of *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1847) (Pisces, Anostomidae) in the Yacyretá Reservoir (Argentina). **Fisheries Research**, v. 74, n. 1–3, p. 198–209, 2005.

ASHIKAGA, F. Y. et al. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 7, p. 1845–1855, 2015.

ASMUSSEN, M. A.; ARNOLD, J.; AVISE, J. C. Definition and properties of disequilibrium statistics for associations between nuclear and cytoplasmic genotypes. **Genetics**, v. 115, n. 4, p. 755–768, 1987.

BANDELT, H.-J. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.

BARBOSA, A. C. D. R. et al. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 3, p. 936–938, 2006.

BARBOSA, A. C. D. R. et al. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 357–360, 2008.

BATISTA, J. S.; ALVES-GOMES, J. A. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 4, p. 723–740, 2006.

BELKHIR, K. et al. **GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations**. Montpellier, 2004.

BILLINGTON, N.; HEBERT, P. D. N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, n. 1, p. 80–94, 1991.

BIRINDELLI, J. L. O.; BRITSKI, H. A.; LIMA, F. C. T. New species of *Leporinus* from the Rio Tapajós Basin, Brazil, and redescription of *L. moralesi* (Characiformes: Anostomidae). **Copeia**, n. 2, p. 238–247, 2013.

BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 4, 2014.

BRAGA-SILVA, A.; GALETTI JR, P. M. Evidence of isolation by time in freshwater migratory fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Hydrobiologia**, v. 765, n. 1, p. 159–167, 2016.

BRITTO, S.; SIROL, R.; VIANNA, N. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Horizonte, 2003.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.

CALCAGNOTTO, D.; DESALLE, R. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: Evidence from microsatellites. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 607–616, 2009.

CARRILLO-AVILA, M. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish Jaú, *Zungaro jahu* (Siluriformes, Pimelodidae). **Conservation Genetics**, v. 10, n. 5, p. 1597–1599, 2009.

CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; GALETTI, P. M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 377–380, 2008.

CARVALHO, D. C.; BEHEREGARAY, L. B. Conservation genetics of the threatened catfish *Conorhynchos conirostris* (Siluriformes : incertae sedis), an evolutionary relict endemic to the São Francisco River Basin , Brazil. **Conservation Genetics**, 2018.

CARVALHO, P. H. et al. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion , vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region. **Mitochondrial DNA**, v. 1736, p. 1–7, 2015.

CASSONE, B. J.; BOULDING, E. G. Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. **Marine Biology**, v. 149, n. 2, p. 213–226, 2006.

CHENG, F. et al. Microsatellite DNA variation among samples of bronze gudgeon, *Coreius heterodon*, in the mainstem of the Yangtze River, China. **Ichthyological Research**, v. 60, n. 2, p. 165–171, 2013.

CORANDER, J. et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 539, 2008.

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.

DA SILVA, P. S. et al. Importance of reservoir tributaries to spawning of migratory fish in the Upper Paraná river. **River research and applications**, v. 31, p. 313–322, 2015.

DARRIBA, D. et al. **JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing** *Nature Methods* Nature Publishing Group, , 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.2109>>. Acesso em: 30 jun. 2016

DI RIENZO, A. et al. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Genetics**, v. 91, p. 3166–3170, 1994.

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 5, p. 1185–1192, 2005.

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.

ESGUÍCERO, A. L. H.; ARCIFA, M. S. The fish fauna of the Jacaré-Guaçu River basin, Upper Paraná River basin. **Biotaneotropica**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2011.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

FERREIRA, D. G. et al. Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, n. 1, p. 209–231, 2017.

FLECKER, A. S. et al. **Migratory Fishes as Material and Process Subsidies in Riverine Ecosystems**American Fisheries Society Symposium. Disponível em: <http://www.dartmouth.edu/~btaylor/index/Publications_files/flecker_etal_2010_AFSS_migrator-fishes.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2018.

FONSECA, F. S. et al. Genetic diversity of an imperiled neotropical catfish and recommendations for its restoration. **Frontiers in Genetics**, v. 8, 2017.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915–925, 1997.

GALTIER, N. et al. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 22, p. 4541–4550, 2009.

GARAVELLO, REIS, S. Geographic variation in *Leporinus friderici* (Bloch) (Pisces: Ostariophysi: Anostomidae) from the Paraná-Paraguay and Amazon River basins. p. 197–200, 1992.

GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A. Family Anostomidae. In: **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 71–84.

GARCEZ, R.; CALCAGNOTTO, D.; DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 21, n. 3, p. 268–275, 2011.

GERLACH, G. et al. Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics! **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 3845–3852, set. 2010.

GÉRY, J.; MAHNERT, V.; DLOUHY, C. Poisson Characoïdes non Characidae du Paraguay (Pisces, Ostariophysii). **Revue Suisse De Zoologie**, v. 94, n. 2, p. 357–464, 1987.

GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices**, 2001.

GOUSKOV, A. et al. Fish population genetic structure shaped by hydroelectric power plants in the upper Rhine catchment. **Evolutionary Applications**, v. 9, n. 2, p. 394–408, 2016.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá. EDUEM, 2007, p. 241.

GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 5, p. 415–426, 1998.

HARPENDING, H. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Hum Biol**, p. 591–600, 1994.

HATANAKA, T.; GALETTI JR., P. M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 19–25, 2003.

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JR, P. M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v. 126, n. 1–2, p. 153–159, 2006.

HENDRY, A. P.; BERG, O. K.; QUINN, T. P. Condition Dependence and Adaptation-

by-Time: Breeding Date, Life History, and Energy Allocation within a Population of Salmon. **Oikos**, v. 85, n. 3, p. 499, 1999.

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

HOEINGHAUS, D. J. et al. Effects of river impoundment on ecosystem services of large tropical rivers: Embodied energy and market value of artisanal fisheries. **Conservation Biology**, v. 23, n. 5, p. 1222–1231, 2009.

JOMBART, T. et al. Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. **Heredity**, v. 101, n. 1, p. 92–103, 2008.

JOMBART, T. Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, n. 11, p. 1403–1405, 2008.

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**, v. 11, n. 94, 2010.

JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 18, p. 4015–4026, 2008.

JÚLIO JÚNIOR, H. F. et al. A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 709–718, 2009.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099–1106, 14 fev. 2007.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

KNOWLES, L. L.; RICHARDS, C. L. Importance of genetic drift during Pleistocene divergence as revealed by analyses of genomic variation. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 4023–4032, 2005.

- KOPELMAN, N. M. et al. Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 5, p. 1179–1191, set. 2015.
- KUSUKAWA, N. et al. Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. **Biotechniques**, v. 9, p. 66–72, 1990.
- 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.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.
- LOPES, U. C. **Caracterização genético-populacional de *Prochilodus nigricans* (Prochilodontidae) na sub-bacia do rio Tapajós**. Universidade Federal de São Carlos, 2018.
- LUI, R. L. et al. A recent transposition of river involving Paraná and São Francisco basins: Effects on the genetic variability and structure of the neotropical fish *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes, Auchenipteridae). **Mitochondrial DNA**, v. 23, n. 5, p. 388–395, 2012.
- LUIKART, G. et al. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 3, p. 238–247, 1998.
- LUIKART, G.; CORNUET, J.-M. Empirical Evaluation of a Test for Identifying Allele Recently Data Bottlenecked Populations from Frequency. **Society of Conservation Biology**, v. 12, n. 1, p. 228–237, 1998.
- 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.
- MONDIN, L. A. DE C. et al. Genetic pattern and demographic history of *Salminus brasiliensis*: Population expansion in the pantanal region during the Pleistocene.

Frontiers in Genetics, v. 9, 2018.

MORELLI, K. A. et al. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 32–34, 2007.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987.

NEI, M.; TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics**, v. 97, n. 1, p. 145–163, 1981.

NUNES, A. G. **Estruturação genética populacional de *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) na bacia do Alto Paraná**. Universidade Federal de São Carlos, 2015.

O'CONNELL, M.; WRIGHT, J. M. Microsatellite DNA in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, p. 331–363, 1997.

OLIVEIRA, E. J. et al. **Origin, evolution and genome distribution of microsatellites** **Genetics and Molecular Biology**, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/gmb/v29n2/a18v29n2.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2018

OLIVEIRA, K. K. C. **Desenvolvimento e validação de microssatélites para estudos genéticos do piau-verdadeiro, *Leporinus elongatus* (valenciennes, 1850), na bacia do São Francisco**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

OLIVEIRA, K. K. C.; LIMA, A. P. S.; COIMBRA, M. R. M. Isolation and characterization of the first microsatellite markers in the Neotropical freshwater fish piau-verdadeiro, *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). **Conservation Genetics Resources**, v. 7, n. 1, p. 77–79, 2015.

ORSI, M. L. **Estratégias reprodutivas de peixes**. Universidade Estadual Paulista, 2005.

PAIVA, A. L. B.; KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 5, p. 1078–1080, set. 2008.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, n. 2, p. 215–225, 2009.

PIRES, A. A. et al. Molecular analysis reveals hidden diversity in *Zungaro* (Siluriformes: Pimelodidae): a genus of giant South American catfish. **Genetica**, v. 145, n. 3, p. 335–340, 2017.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reduction in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, n. 47, p. 502–503, 1999.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**, 2017. Disponível em: <<https://www.gnu.org/copyleft/gpl.html>>. Acesso em: 25 out. 2017

RAMBAUT, A. et al. **Tracer v1.6**, 2014.

RAMIREZ, J. L. et al. Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (characiformes: Anostomidae). **Frontiers in Genetics**, v. 8, 2017.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L. O.; GALETTI, P. M. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): Diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 107, p. 308–323, 2017.

RAMOS, J. V. B. et al. Genetic diversity of the species *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes) in the canoas complex - Paranapanema river. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 4, p. 821–828, 2012.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, p. 1280–1283, 1995.

RENNO, J. F. et al. Intraspecific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and 48 Brazil: a genetic approach to the refuge theory. **J. Fish Biol.**, v. 36, p. 85–95, 1990.

RENNO, J. F. et al. Polymorphism of mitochondrial genes in populations of *Leporinus friderici* (Bloch, 1794): intraspecific structure and zoogeography of the Neotropical fish. **Genetica**, p. 137–142, 1991.

RIBOLLI, J. et al. Isolation-by-time population structure in potamodromous Dourado *Salminus brasiliensis* in southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 18, n. 1, p. 67–76, 2017.

RIBOLLI, J. et al. Genetic evidences of non-reproductive shoaling in the freshwater fish *Salminus brasiliensis*. **Hydrobiologia**, v. 815, n. 1, p. 65–72, 2018.

RIBOLLI, J.; MELO, M. R. C.; ZANIBONI-FILHO, E. Genetic characterization of the Neotropical catfish *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) in the Upper Uruguay River. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 761–769, 2012.

RICE, W. R. Analyzing Tables of Statistical Tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223, jan. 1989.

RINGUELET, R. A. Zoogeografía y ecología de los peces de aguas continentales de la Argentina y consideraciones sobre las áreas ictiológicas de América del Sur. **Ecosur**, v. 2, n° 3, 1975.

RODRÍGUEZ, T. T. et al. Evaluating vertical-slot fishway designs in terms of fish swimming capabilities. **Ecological Engineering**, v. 27, p. 37–48, 2006.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. **Mol. Bid. Evol.**, v. 9, n. 3, p. 552–569, 1992.

ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 2017.

RUEDA, E. C. et al. Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. **Genetica**, v. 141, n. 7–9, p. 401–407, 26 set. 2013.

SALLUN, A. E. M.; SUGUIO, K. Quaternary colluvial episodes (Upper Paraná River Hydrographic Basin, Brazil). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 3, p. 701–715, 2010.

SANCHES, A. et al. Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the Sao Francisco River in Brazil and its significance for conservation. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 40, n. 1, p. 177–186, 2012.

SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 67, p. 889–895, 2007.

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 33–44, 2007.

SANTOS, M. C. F.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. A Multilocus Approach to Understanding Historical and Contemporary Demography of the Keystone Floodplain Species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). **Frontiers in Genetics | www.frontiersin.org**, v. 1, p. 263, 2018.

SANTOS, M. L.; STEVAUX, J. C. Facies and architectural analysis of channel sandy macroforms in the upper Parana river. **Quaternary International**, v. 72, p. 87–94, 2000.

SAULO-MACHADO, A. C. et al. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 2, p. 307–310, 2011.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. February, p. 233–234, 2000.

SIDLAUSKAS, B. L.; VARI, R. P. Diversity and distribution of anostomoid fishes (Teleostei : Characiformes) throughout the Guianas. **Cybium**, v. 36, n. 1, p. 71–103, 2012.

SILVA-SANTOS, R. et al. Molecular evidences of a hidden complex scenario in *Leporinus cf. friderici*. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 47, 2018.

SILVA, J. V. DA et al. Genetic structuring of *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characiformes) in the rio Paraná basin as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA markers. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 547–556, 2015.

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, n. 2, p. 407–417, 2001.

STEVAUX, J. C.; SOUZA, I. A. Floodplain construction in an anastomosed river. **Quaternary International**, v. 114, n. 1, p. 55–65, jan. 2004.

TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 3–4, p. 283–291, 2008.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585–595, 1989.

TAJIMA, F. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. **Genetics**, v. 143, n. 3, p. 1457–1465, 1996.

TANIGUCHI, N. Genetic factors in broodstock management for seed production. **Fish Biology and Fisheries**, v. 13, p. 175–185, 2003.

TEMPLETON, A. R.; ROUTMAN, E.; PHILLIPS, C. A. Separating Population Structure from Population History: A Cladistic Analysis of the Geographical Distribution of Mitochondrial DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics**, v. 140, n. 2, p. 767–782, 1995.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.

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

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

WRIGHT, S. The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. **Evolution**, v. 19, n. 3, p. 395–420, 1965.

2. 8 Material suplementar 2

2.8.1 Protocolos

Protocolo S2.1 Protocolo de extração de DNA segundo o método Aljanabi & Martinez. (1997). com algumas alterações:

O DNA das amostras das duas espécies e *Leporinus cf. friderici* Paraná e *Megaleporinus obtusidens* foi extraído a partir de fragmentos de nadadeira que estavam fixados em álcool 100%.

1. Um pedaço de nadadeira de aproximadamente 3mm de comprimento de cada um dos indivíduos foi colocado em microtubos individuais de volume de 1,5ml identificados;
2. A essas amostras foram adicionados 450µl de solução tampão salino pH= 8.0 (NaCl₂ 0.4mol/l; TrisHCl 10mmol/l e EDTA 2mmol/l); 40µl de SDS 10% e 8µl de Proteinase K na concentração de 20mg/ml;
3. Essa mistura foi agitada em vortex por 10 segundos;
4. Após a agitação. as amostras foram incubadas a 55°C por aproximadamente 5 horas ou até a total digestão do tecido;
5. Após a digestão foram adicionados 300µl de NaCl₂ a 6M e as amostras foram agitadas por 30 segundos;
6. A mistura de material digerido com tampão salino, SDS e Proteinase K e NaCl₂ foi centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm em microcentrífuga;
7. Posterior a centrifugação, o sobrenadante de cada uma das amostras foi transferido para novos microtubos devidamente identificados;
8. Ao sobrenadante nos novos microtubos foram adicionados o dobro de volume de isopropanol gelado;
9. Essa mistura foi agitada cuidadosamente e posteriormente incubada no freezer a -20°C por pelo menos 2h;

10. Posteriormente à incubação no freezer, a mistura foi centrifugada por 30 min a 12.000 rpm em microcentrífuga;
11. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado com 500µl de etanol 70%;
12. Essa mistura foi centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm em microcentrífuga;
13. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500µl de etanol 100%;
14. Essa mistura foi centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm em microcentrífuga;
15. Após a centrifugação, verteu-se o sobrenadante e em seguida o microtubo com o *pellet* de DNA foi acondicionado em estufa a 37°C por aproximadamente 1 hora;
16. Após a secagem do *pellet* de DNA foram adicionados 80µl de água Milli-Q autoclavada;
17. O DNA foi estocado em freezer a -20°C.

Protocolo S2.2 Protocolo de purificação de DNA segundo o método de Kusukawa et al. (1990) com algumas alterações:

1. Em um microtubo de 200µl. uma solução de PEG/Glicogênio azul foi adicionada. em igual volume às amostras que seriam purificadas;
2. Essa mistura foi homogeneizada e incubada em banho seco a 37°C por vinte minutos;
3. Passados os vinte minutos, a solução foi centrifugada durante oito minutos a 13.000 rpm;
4. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 125µL de etanol 80% gelado e novamente centrifugado por quatro minutos em igual rotação à centrifugação anterior;
5. O sobrenadante mais uma vez foi descartado e foram adicionados ao *pellet* 125µL de etanol 80% gelado. Essa mistura foi centrifugada por dez minutos a 13.000 rpm;
6. O sobrenadante foi secado a 37°C por cerca de 40 minutos. Após a secagem o *pellet* foi suspenso novamente com 10 µL de água miliQ.

2.8.2 Tabelas

Tabela S2.1 Informações dos locos de microssatélites que foram utilizados em *Leporinus cf. friderici* Paraná e *Megaleporinus obtusidens*. Os dados fornecidos são referentes ao nome do *primer*, o *motif* de repetição em cada espécie, as sequências *forward* (F) e *reverse* (R) de cada loco, com destaque em negrito para a cauda M13 adicionada e a temperatura de anelamento dos *primers* em cada espécie. Os locos denominados Lobt e Lolar foram desenvolvidos para *Megaleporinus obtusidens* (OLIVEIRA. 2012; 2015; VILLANOVA. 2015, respectivamente) e os locos Lmac foram desenvolvidos para *Megaleporinus macrocephalus* (MOREIRA. 2007). *Locos cujo *motif* de repetição apresentou diferença do *motif* original descrito nos artigos.

Loco	<i>Motif</i> descrito originalmente	<i>Motif</i> em <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	<i>Motif</i> em <i>Megaleporinus obtusidens</i>	Sequências dos <i>primers</i> (5' - 3')
Lobt 01	(GACA) ₉	(GACA) ₅	(GACA) ₁₀	F: CGGAAACACTGCGGAG R: TGTA AACGACGGCCAGT AATTATAGGAACCGTCTGG
Lobt 06	(GACA) ₇	(GGAT) ₆ *	(GACA) ₅	F: TGTA AACGACGGCCAGT AGTGC GTTCGTGAAATGTAGTG R: TCAGTCCATCTGTGCTTCAGTT
Lobt 08	(GA) ₂₁	(TC) ₁₂ *	(TC) ₃₂ *	F: TGTA AACGACGGCCAGT CTATCCACCACTGCCTTGAC R: GGCTTATTTCACTCTCTACTC
Lobt 09	(GATA) ₁₄	Não amplificado	(GATA) ₁₄	F: TGTA AACGACGGCCAGT TCTGCATGACTAGGTGTTTG R:CTCTACCACCTCTGACTATAACA
Lolar 5	(ATCC) ₆	(ATCC) ₉	(ATCC) ₉	F: TGTA AACGACGGCCAGT AACCTCCATCTGACACCCATA R: GGGACAAAGCGGAGGATAAT
Lolar 8	(ATCT) ₁₂	Não amplificado	(ATCT) ₁₃	F: TGTA AACGACGGCCAGT TCTCACGTTCCCTCTCTCACG R: CGGGCCAAAAACAGAGATAG
Lolar 15	(TTCA) ₇	Não sequenciado	(TTCA) ₇	F: TGTA AACGACGGCCAGT CCTCCCACCTCTACCCTTTC

Lmac 02	(TG)28(AG) ₁₀	(TG) ₁₅ *	Não amplificado	R: GCAGAGGCAGAGTCAGCAG F: TGTA AACGACGGCCAGT ACTTCCCTCCCTAATCTGTG R: AGGGTGTAAGATGTATGAAG
Lmac 05	(CT) ₁₄	(CT) ₂₃	(CT) ₁₄	F: CGTGTGCTTCTGTTTGTGTG R: TGTA AACGACGGCCAGT GGCTGAAGTATGAGAGGTAAG
Lmac 06	(CA) ₁₇	(CA) ₁₁	(CA) ₇	F: TGTA AACGACGGCCAGT CTCTACTTCACTTTTACAGCAG R: CCCGAGCCGCGTCACACTTC
Lmac 07	(TC) ₁₇	(TC) ₈	(TC) ₁₇	F: TGTA AACGACGGCCAGT GTGGGAACATTTGGGATTAT R: CAGAAGAGAGGGCGAGAGGG
Lmac 08	(TC) ₂₃	Não amplificado	(TC) ₄₂	F: TGTA AACGACGGCCAGT CCATTTCTGTCTTACCTTTG R: CTCGGGAGTTGACAGCACC

Tabela S2.2 Informações dos locos de microsatélites que foram utilizados em *Leporinus cf. friderici* Paraná e *Megaleporinus obtusidens*. Os dados fornecidos são referentes ao nome do *primer*, o fluoróforo utilizado na amplificação de cada loco para cada espécie. Informações sobre quais locos foram amplificados em cada espécie, temperatura de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados.

Loco	Fluoróforo utilizado em <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná / <i>Megaleporinus obtusidens</i>	Amplificado em <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná	Amplificado em <i>Megaleporinus obtusidens</i>	Temperatura de anelamento (°C) em <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná/ <i>Megaleporinus obtusidens</i>	Tamanho do fragmento em <i>Leporinus cf. friderici</i> Paraná/ <i>Megaleporinus obtusidens</i>
Lobt 01	VIC/ FAM	x	x	58/ 58	130-174/ 127-151
Lobt 06	HEX/ FAM	x	x	58/ 60	209-221/ 205-229
Lobt 08	VIC/ NED	x	x	56/ 56	140-168/ 153-173
Lobt 09	NED	não amplificado	x	57	191-287
Lolar 5	PET/ PET	x	x	58	156-188/
Lolar 8	FAM	não amplificado	x	58	141-185
Lolar 15	FAM/ FAM	x	x	63/ 63	193-229/ 210-258
Lmac 02	VIC	x	não amplificado	57	226-238
Lmac 05	NED/ NED	x	x	58/ 56	252-276/ 225-231
Lmac 06	VIC/ VIC	x	x	56/ 56	125-129/ 127-167

H15	A	.
H16
H17
H18	T
H19	A	.
H20	A	.
H21	G	.	.	A	.
H22	A	.
H23	A	.
H24	C
H25	A	.
H26	.	G
H27	C
H28	C
H29	T
H30	.	.	A	.	T
H31	T	A
H32	T	A	.
H33	T
H34	T
H35	T
H36	.	.	.	T	A	.
H37	T	.	.	.	T	A	.
H38	.	.	A	.	T
H39	A	.
H40	T	.	.	.	G

Tabela S2.4 Parâmetros de variação genética para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná, baseados nas sub-bacias amostradas em sete locos de microsatélites.

Mogi Guaçu (pontos 1 e 4)								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	7	6	6	7	7	7	7	6,714
A	3	3	4	3	2	2	2	2,714
Ae	2,177	1,945	3,272	1,555	1,960	1,507	1,324	1,963
Ho	0,428	0,333	1,000	0,142	0,571	0,428	0,000	0,415
He	0,540	0,486	0,694	0,357	0,489	0,336	0,244	0,450
Fis	0,280	0,394	-0,364	0,647	-0,091	-0,200	1,00	0,137
P _L	0,2866	0,2750	1,000	0,0911	0,8598	1,000	0,0670	0,1152
Ps	0,9116	0,9679	0,1804	1,000	0,7089	0,7616	1,000	0,8964
P _{EHW}	0,6272	0,5156	1,000	0,0768	1,000	1,000	0,0769	-
Ra	2,400	2,409	3,311	2,121	1,990	1,846	1,692	1,989
Mogi Guaçu (pontos 2 e 3)								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	14	11	14	14	12	14	14	13,286
A	6	2	2	7	3	5	4	2,301
Ae	4,454	2	1,773	5,369	1,811	1,587	2,703	3,097
Ho	0,785	0,454	0,5	0,25	0,5	0,357	0,285	0,448
He	0,775	0,5	0,436	0,447	0,436	0,369	0,630	0,514
Fis	0,024	0,138	-0,110	0,476	-0,110	0,071	0,572	0,235
P _L	0,5402	0,5598	0,8518	0,0473	0,8277	0,4625	0,0036	0,0170
Ps	0,7464	0,8652	0,6018	0,9964	0,6018	0,8929	1,000	0,9839
P _{EHW}	0,2303	1,000	1,000	0,0289	1,000	0,3776	0,0024*	-
Ra	3,742	1,988	1,928	2,244	1,928	2,206	2,839	2,410

Grande								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	13	12	11	13	10	11	12	12
A	4	3	6	2	4	5	10	3,286
Ae	2,793	1,986	5,5	1,742	2,298	2,326	7,578	2,053
Ho	0,769	0,5	0,454	0,615	0,6	0,636	0,666	0,561
He	0,642	0,4965	0,818	0,426	0,565	0,570	0,868	0,494
Fis	-0,159	0,036	-0,200	0,172	-0,412	-0,009	-0,069	0,063
PL	0,8670	0,5170	1,000	0,5357	1,000	0,6411	0,7500	0,8464
Ps	0,3250	0,6661	0,4402	0,9098	0,1920	0,6482	0,5170	0,1554
P _{EHW}	0,5504	0,4717	1,000	0,5228	0,2442	0,0834	1,000	-
Ra	2,840	2,190	2,158	1,832	1,919	2,691	2,710	2,334
Turvo								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	20	18	17	19	17	17	20	18,14
A	6	3	9	3	5	4	12	4,143
Ae	4,102	2,196	4,551	1,52	2,875	2,321	6,504	2,54
Ho	0,65	0,666	0,705	0,315	0,705	0,235	0,65	0,539
He	0,756	0,544	0,780	0,342	0,652	0,569	0,846	0,575
Fis	0,166	-0,196	0,200	-0,231	0,104	-0,052	0,606*	0,120
PL	0,1205	0,8759	0,1938	0,9455	0,5107	0,7509	0,0009	0,0982
Ps	0,9598	0,2509	0,9241	0,1473	0,8420	0,4821	1,000	0,9027
P _{EHW}	0,4657	0,8071	0,0511	0,3190	0,6040	0,4068	0,0022*	-
Ra	3,616	2,275	2,777	2,464	1,891	3,096	2,601	2,674
Claro								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	9	9	3	7	4	4	7	6,286

A	3	2	2	2	3	2	6	2,286
Ae	2,417	1,905	2	1,689	1,684	1,28	4,083	1,709
Ho	0,888	0,777	0,333	0,571	0,500	0,250	0,428	0,546
He	0,586	0,475	0,5	0,408	0,406	0,218	0,755	0,478
Fis	-0,471	-0,600	0,000	-0,273	-0,333	-0,091	0,000	-0,294
P _L	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Ps	0,0598	0,1464	1,000	0,6223	0,5402	0,8536	1,000	0,0036
P _{EHW}	0,2764	0,1765	-	1,000	1,000	1,000	-	-
Ra	2,636	1,975	2,000	1,885	1,930	2,500	1,750	2,096
Verdinho								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	10	9	8	10	7	8	10	8,77
A	3	2	7	2	3	2	9	2,571
Ae	2,816	1,384	3,368	1,6	1,555	1,438	6,25	1,877
Ho	0,7	0,333	0,375	0,1	0,142	0,375	0,5	0,397
He	0,645	0,277	0,703	0,375	0,357	0,304	0,84	0,434
Fis	-0,033	-0,143	-0,313	0,308	0,757	0,647	-0,167	0,260
P _L	0,6714	1,000	0,9000	0,2982	0,0652	0,0839	1,000	0,1071
Ps	0,6009	0,8304	0,2098	0,9250	1,000	1,000	0,7893	0,8973
P _{EHW}	0,5002	1,000	0,2802	0,4399	0,0464*	0,0767	1,000	-
Ra	2,781	1,730	2,255	2,417	1,871	2,121	1,786	2,137
Tietê								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	15	14	12	15	11	14	15	13,66
A	9	2	8	2	5	7	9	4,571
Ae	4,736	1,773	6,545	1,8	2,283	2,947	5,769	2,553
Ho	0,466	0,357	0,333	0,266	0,545	0,357	0,6	0,439

He	0,788	0,436	0,847	0,444	0,561	0,660	0,826	0,651
Fis	0,437*	0,217	-0,145	0,157	0,429	0,077	0,488	0,316*
PL	0,0009	0,4295	0,8482	0,3804	0,1411	0,4902	0,0027	0,0009
Ps	1,000	0,9196	0,3580	0,8955	0,9884	0,8536	1,000	1,000
P _{EHW}	0,0022*	0,5546	0,9108	0,5952	0,2325	0,0887	0,0039*	-
Ra	3,961	1,928	2,797	2,067	1,934	2,922	3,289	2,699
Paraná								
	Lobt 01	Lobt 06	Lmac 02	Lmac 06	Lmac 07	Lolar 5	Lolar 15	Média
N	31	27	22	31	24	31	24	28,571
A	5	4	8	3	5	7	11	4,714
Ae	2,753	2,401	3,532	1,422	1,939	3,798	7,629	2,370
Ho	0,516	0,555	0,409	0,225	0,416	0,354	0,416	0,443
He	0,636	0,583	0,716	0,297	0,484	0,736	0,868	0,617
Fis	0,205	0,067	-0,013	0,102	0,255	0,161	0,530*	0,289*
PL	0,0607	0,4054	0,6000	0,3116	0,1652	0,1920	0,0009	0,0009
Ps	0,9750	0,7429	0,5607	0,8170	0,9661	0,9161	1,000	1,000
P _{EHW}	0,3125	0,0998	0,7548	0,0927	0,2919	0,0478*	0,0000*	-
Ra	2,791	2,473	2,300	2,493	1,766	2,408	3,538	2,538

N = número de indivíduos analisados, A = número de alelos, Ae = número de alelos efetivos, Ho = heterozigidade observada, He = Heterozigidade esperada, Fis = coeficiente de endocruzamento, P_L = p Larger, P_S = p Smaller, P_{EHW} = valores de p para os desvios do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, Ra = riqueza alélica e PIC = conteúdo de informação polimórfica. O nível de significância dos valores de Fis para o $p < 0,00089$. * Valores significativos (nível de significância $p < 0,05$). **Valores significativos após correção de Bonferroni.

Tabela S2.5 Posição dos nucleotídeos polimórficos para os dezoito haplótipos de D-loop identificados para a espécie *Megaleporinus obtusidens*. Os números correspondem aos sítios polimórficos.

	39	81	201	241	251	253	290	292	632	642	662	664	666	750	932
H1	G	C	T	T	T	C	T	A	C	T	G	A	T	G	G
H2	.	.	.	C	.	T	A	G	.	.	.
H3	T	C	.	.	.	A
H4	.	.	C	C	.	T	A	G	.	.	.
H5	.	T	C	C	.	T	A	G	.	.	.
H6	T	C	.	.	.	A	G	.	.	.
H7	.	.	C	C	.	T	.	.	T	.	A	G	.	.	.
H8	A	.	C	.	.	T	.	.	T	.	A	G	.	.	.
H9	.	.	C	A
H10	T	A	G	.	.	.
H11	.	.	C	.	.	T	A	G	.	.	A
H12	T	A
H13	.	.	.	C	.	T	A	G	.	A	.
H14	.	.	.	C	C	T	A	G	C	.	.
H15	.	.	.	C	.	T	.	.	.	C	A
H16	.	.	.	C	C	T	A	G	.	.	.
H17	.	.	.	C	.	T	.	T	.	.	A	G	.	.	.
H18	.	.	.	C	.	T	.	.	.	C	A	G	.	.	.

Tabela S2.6 Parâmetros de variação genética para a espécie *Megaleporinus obtusidens* Paraná baseados nas sub-bacias amostradas.

	Mogi Guaçu (pontos 1 e 4)										
	Lobt 01	Lobt 06	Lobt 08	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lolar 5	Lolar 8	Lolar 15	Média
N	22	24	23	25	19	24	25	23	20	23	22,8
A	7	7	11	4	9	8	16	7	3	8	8
Ae	3872	2,946	6,33533	1,899	4,323	4,347	6,983	3,102	1,965	1,790	3,756
Ho	0,545	0,458	0,739	0,52	0,421	0,875	0,56	0,608	0,45	0,304	0,548
He	0,741	0,660	0,842	0,473	0,768	0,769	0,856	0,677	0,491	0,441	0,672
Fis	0,286	0,325	0,144	-0,078	0,473*	-0,115	0,364*	0,124	0,109	0,330	0,207*
P _L	0,0125	0,0092	0,0825	0,7592	0,0008	0,9458	0,0008	0,2083	0,3575	0,0150	0,0008
Ps	0,9983	0,9983	0,9742	0,4242	1,000	0,1708	1,000	0,9175	0,8475	1,000	1,000
P _{EHW}	0,0079*	0,0050*	0,2317	1,000	0,0006*	0,8406	0,0000*	0,2646	0,0497*	0,0353*	-
Ra	6,061	5,074	8,542	2,880	7,320	6,720	11,063	5,556	2,993	5,380	6,158
	Mogi Guaçu (pontos 2 e 3)										
	Lobt 01	Lobt 06	Lobt 08	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lolar 5	Lolar 8	Lolar 15	Média
N	14	14	15	15	15	14	15	14	14	15	14,5
A	6	4	7	2	11	8	16	5	3	7	6,9
Ae	4,784	3,531	4,411	1,8	6,081	2,992	9,375	2,861	1,446	2,5	3,978
Ho	0,785	0,642	0,533	0,533	0,6	0,785	0,8	0,642	0,214	0,333	0,587
He	0,790	0,716	0,773	0,444	0,835	0,665	0,893	0,650	0,308	0,6	0,667
Fis	0,043	0,140	0,341	-0,167	0,313	-0,144	0,138	0,049	0,339	0,472	0,156
P _L	0,4875	0,2800	0,0133	0,8892	0,0108	0,9433	0,0892	0,5100	0,1558	0,0050	0,0017
Ps	0,7733	0,8742	0,9983	0,4925	0,9967	0,2742	0,9842	0,7183	0,9917	1,000	0,9992
P _{EHW}	0,8273	0,4861	0,0101*	1,000	0,0130*	0,7317	0,1021	0,8096	0,1521	0,0010*	-
Ra	5,779	3,999	6,186	2,000	9,319	6,927	13,124	4,706	2,954	6,071	6,106

Turvo											
	Lobt 01	Lobt 06	Lobt 08	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lolar 5	Lolar 8	Lolar 15	Média
N	27	27	27	27	25	27	25	26	27	27	26,5
A	5	5	9	3	15	7	23	6	11	6	9
Ae	3,767	2,870	6,877	2,073	5,681	3,691	17,361	2,828	3,709	1,312	5,017
Ho	0,518	0,592	0,814	0,518	0,92	0,740	0,6	0,653	0,592	0,222	0,617
He	0,734	0,651	0,854	0,517	0,824	0,729	0,942	0,646	0,730	0,237	0,686
Fis	0,311	0,109	0,065	0,018	-0,096	0,003	0,381*	0,008	0,207	0,085	0,120*
P _L	0,0100	0,2400	0,2550	0,5550	0,9583	0,5558	0,0008	0,5708	0,0200	0,3625	0,0008
Ps	0,9992	0,8833	0,8792	0,5992	0,1792	0,6492	1,000	0,6225	0,9975	0,9108	1,000
P _{EHW}	0,0971	0,4152	0,5088	1,000	0,4721	0,2173	0,0000*	0,6146	0,0003*	0,3633	-
Ra	4,780	4,280	7,746	2,407	9,348	6,128	15,181	4,489	7,946	3,430	6,573
Tietê											
	Lobt 01	Lobt 06	Lobt 08	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lolar 5	Lolar 8	Lolar 15	Média
N	29	29	27	29	23	29	28	27	24	28	27,3
A	7	4	9	3	12	7	17	6	9	10	8,4
Ae	4,805	2,506	7,043	2,073	7,503	6,444	9,333	3,082	2,543	2	4,733
Ho	0,586	0,655	0,703	0,724	0,608	0,896	0,571	0,703	0,541	0,464	0,645
He	0,791	0,601	0,858	0,517	0,866	0,844	0,892	0,675	0,606	0,5	0,715
Fis	0,276	-0,073	0,198	-0,384	0,318	-0,044	0,376*	-0,023	0,128	0,089	0,117*
P _L	0,0042	0,7967	0,0133	0,9883	0,0017	0,7842	0,0008	0,6683	0,1642	0,2692	0,0008
Ps	0,9992	0,3608	0,9975	0,0250	1,000	0,4158	1,000	0,5342	0,9508	0,9008	1,000
P _{EHW}	0,0206*	0,8213	0,0927	0,0469*	0,0000*	0,4586	0,0000*	0,2341	0,0046*	0,1599	-
Ra	6,136	3,762	8,224	2,619	9,183	6,773	11,150	5,173	6,479	5,889	6,538
Parapanema											
	Lobt 01	Lobt 06	Lobt 08	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lolar 5	Lolar 8	Lolar 15	Média

N	13	13	13	13	11	13	13	13	11	13	12,6
A	6	6	6	3	8	5	14	5	8	3	6,4
Ae	3,673	2,793	3,448	2	5,261	3,840	10,903	2,541	4,4	1,609	4,047
Ho	0,692	0,692	0,231	0,461	0,545	0,692	0,461	0,461	0,818	0,461	0,551
He	0,727	0,642	0,711	0,5	0,809	0,739	0,908	0,606	0,772	0,378	0,679
Fis	0,089	-0,038	0,696*	0,117	0,368	0,104	0,522*	0,276	-0,011	-0,180	0,228*
P _L	0,3767	0,7225	0,0008	0,4592	0,0108	0,3492	0,0008	0,1317	0,6958	1,000	0,0008
P _s	0,8542	0,5450	1,000	0,7942	0,9992	0,8308	1,000	0,9525	0,6742	0,4825	1,000
P _{EHW}	0,1272	0,8415	0,0001*	1,000	0,0191*	0,1015	0,0000*	0,4061	0,2538	1,000	-
Ra	5,691	5,655	5,926	2,846	8,000	4,995	12,863	4,674	8,000	2,981	6,163
Paraná											
	Lobt 01	Lobt 06	Lobt 08	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lolar 5	Lolar 8	Lolar 15	Média
N	12	12	12	12	12	12	11	12	11	12	11,8
A	6	5	8	2	9	5	12	6	6	7	6,6
Ae	3,348	2,285	5,236	1,384	5,236	2,851	9,68	3,348	2,574	3,272	3,921
Ho	0,583	0,75	0,833	0,333	0,666	0,583	0,636	0,5	0,272	0,5	0,565
He	0,701	0,562	0,809	0,277	0,809	0,649	0,896	0,701	0,611	0,694	0,671
Fis	0,210	-0,294	0,013	-0,158	0,218	0,144	0,333	0,327	0,586	0,320	0,200*
P _L	0,1408	1,000	0,5917	1,000	0,0867	0,2875	0,0050	0,0533	0,0017	0,0308	0,0008
P _s	0,9675	0,0858	0,7200	0,7317	0,9767	0,9108	1,000	0,9925	1,000	0,9942	1,000
P _{EHW}	0,3330	0,8706	0,6663	1,000	0,0446*	0,5067	0,0017*	0,0239*	0,0014*	0,0255*	-
Ra	5,830	4,833	7,746	2,000	8,580	4,993	12,000	5,830	6,000	6,746	6,455

N = número de indivíduos analisados, A = número de alelos, Ae = número de alelos efetivos, Ho = heterozigidade observada, He = Heterozigidade esperada, Fis = coeficiente de endocruzamento, P_L = p Larger, P_s = p Smaller, P_{EHW} = valores de p para os desvios do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, Ra = riqueza alélica e PIC = conteúdo de informação polimórfica. O nível de significância dos valores de Fis para o p < 0,00167. *Valores significativos (nível de significância p<0,05). **Valores significativos após correção de Bonferroni.

2.8.3 Figuras

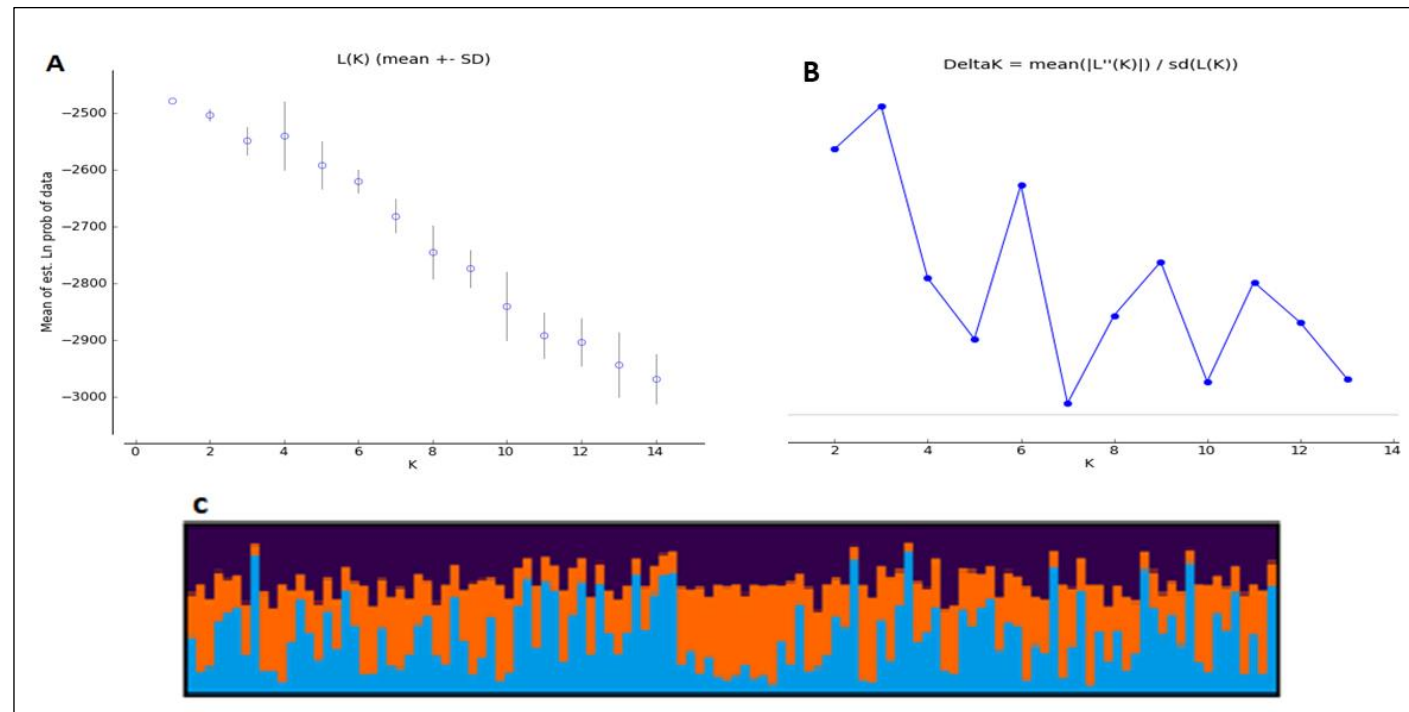


Figura S2.1 **A)** Estimativas de $[\text{LnP}(D)]$ versus o número de populações (K) analisadas através do programa STRUCTURE para a espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná. **B)** Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno *et al.* (2005). **C)** Probabilidade de atribuição dos indivíduos para um $K = 3$. Figura gerada pelo programa CLUMPAK a partir de média (LnProb) = -2529,567 e média (*similarity score*) = 0,934.

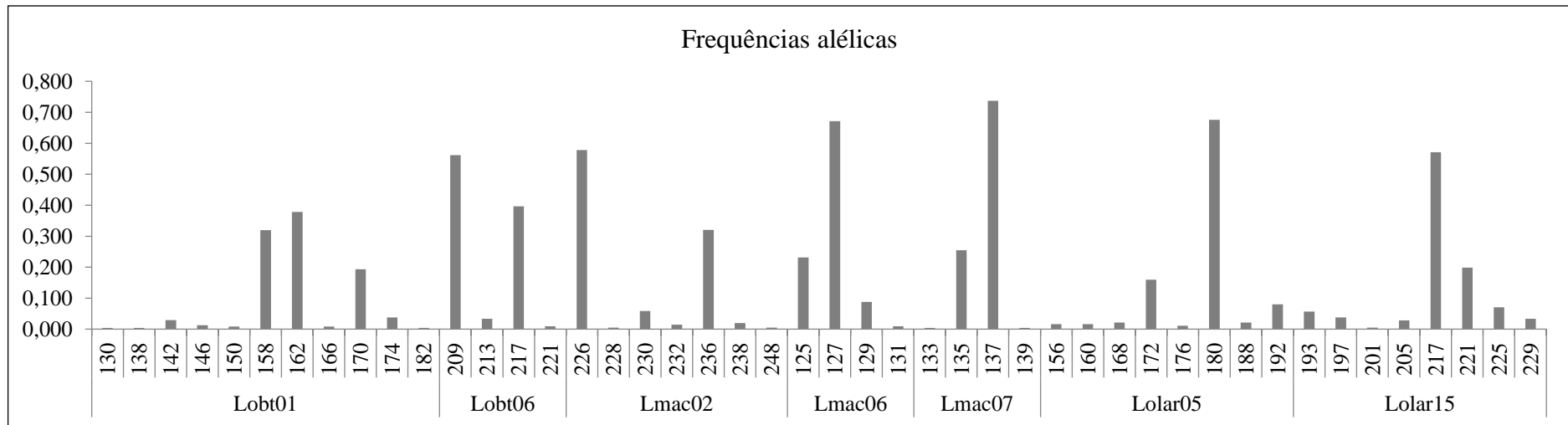


Figura S2.2 Gráfico da distribuição das frequências alélicas, por loco analisado, na espécie *Leporinus cf. friderici* Paraná.

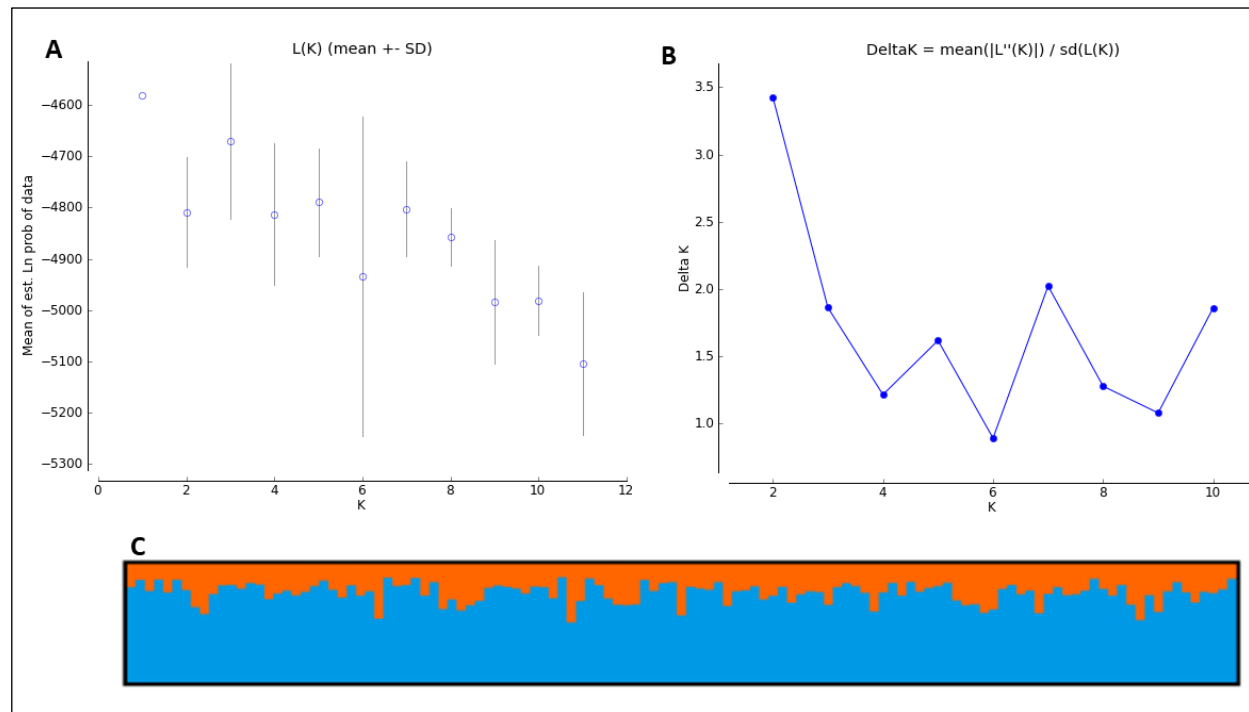


Figura S2.3 **A)** Estimativas de $[\text{LnP}(D)]$ versus o número de populações (K) analisadas através do programa STRUCTURE para a espécie *Megaleporinus obtusidens*. **B)** Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno *et al.* (2005). **C)** Probabilidade de atribuição dos indivíduos para um $K = 2$. Figura gerada pelo programa CLUMPAK a partir de média (LnProb) = -4845,267 e média (*similarity score*) = 0,984.

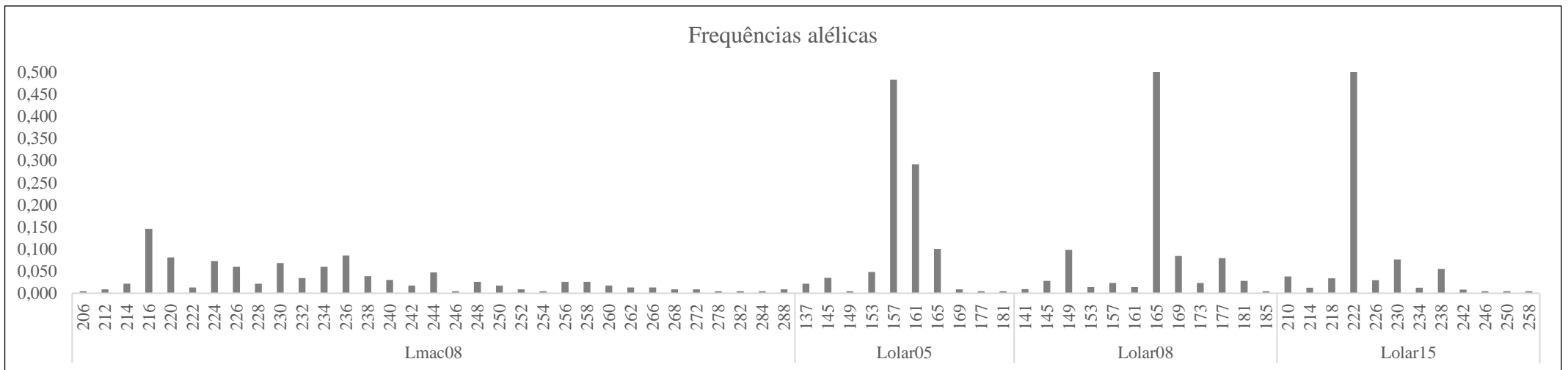
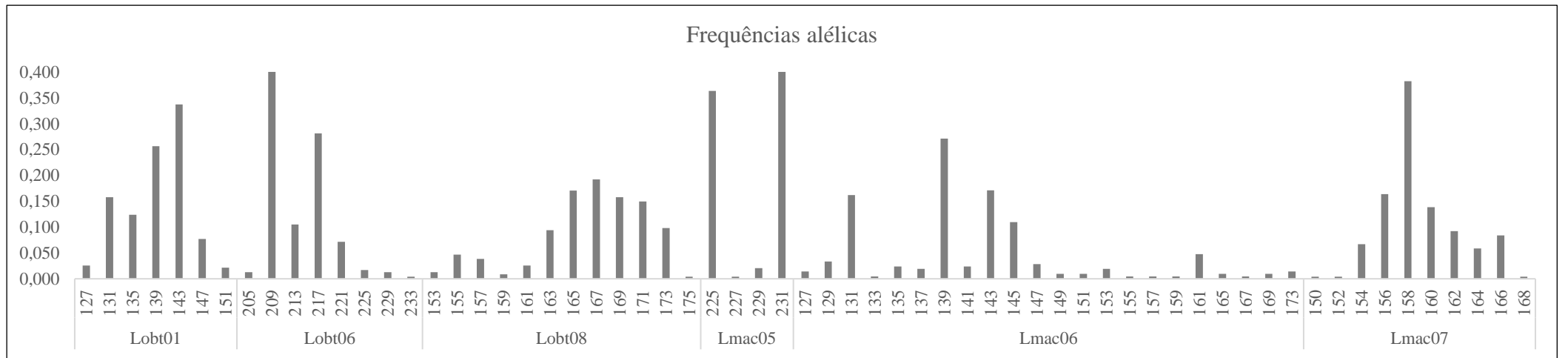


Figura S2.4 Gráficos da distribuição das frequências alélicas, por loco analisado na espécie *Megaleporinus obtusidens*.