

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

ENZO PAOLO ZAVALA CANCHO

**ASSINATURAS GENÉTICAS ASSOCIADAS À ESTRUTURA  
POPULACIONAL EM  
*Salminus brasiliensis* (Cuvier 1816) DO ALTO E MÉDIO RIO  
URUGUAI**

SÃO CARLOS -SP  
2024

ENZO PAOLO ZAVALA CANCHO

**ASSINATURAS GENÉTICAS ASSOCIADAS À ESTRUTURA  
POPULACIONAL DESCRITO EM  
*Salminus brasiliensis* (Cuvier 1816) DO ALTO E MÉDIO RIO  
URUGUAI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Área de concentração:** Genética e Evolução

**Orientador:** Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.

**Coorientador:** Dr. Jorge Ramirez

SÃO CARLOS - SP  
2024

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) pela oportunidade de realizar o mestrado, e à agência de fomento CAPES pelo apoio financeiro para poder me dedicar 100% a esta pesquisa.

Agradeço ao Dr. Jorge Ramirez da Universidade Nacional Mayor de San Marcos, que me encaminhou neste desafio e me aconselhou à distância durante a execução desta pesquisa.

Agradeço ao Dr. Pedro Galetti e à Dra. Patrícia Domingues, principais responsáveis que confiaram em mim para executar este projeto e que me orientaram

Agradeço aos meus amigos e parceiros de trabalho do LabBMC (Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação), de maneira especial a Alexandre Inforzato, pois com sua ajuda pude enriquecer os resultados desta pesquisa. Muito obrigado meu amigo.

Aos amigos que fiz durante meu tempo em São Carlos: Ricardo, Taina, Aaron, Gaston, León, Luís, Katia, todos meus amigos da Capoeira, que me fizeram sorrir na hora, obrigado por todos os momentos compartilhados ... “*O mestrado são os amigos que fizemos no caminho kkkkk*” ... de maneira especial para Laura Penalva, que teve o tempo de corrigir a ortografia deste documento.

Agradeço a meus amigos do Peru, Harold, Raúl e Mario que, tanto no final da graduação como durante o Mestrado, sempre estiveram presentes quando precisei deles. Espero tê-los sempre lá para mim. Y Dale U!

Por fim, agradeço a minha mãe Maria Luisa e meu pai Billy, que sempre me apoiam em todos os meus projetos e por sempre cuidarem de mim, mesmo à distância.

*“Pero no es una simple rosa, es tu rosa ... Y es el tiempo que le has dedicado lo que  
la hace tan importante”*

**El principito, Antoine De Saint-Exupery**

## RESUMO

A região Neotropical é reconhecida por sua alta biodiversidade, da qual os peixes Ostaryophysi representam um grupo de ampla diversidade. Dentre esses peixes, destacam-se aqueles que realizam movimentos migratórios de longa distância, os quais ocorrem naturalmente durante as estações anuais de reprodução nas bacias tropicais. Ainda há muito a investigar sobre como esse comportamento se reflete na estrutura genética dos peixes migratórios de água doce, como o *Salminus brasiliensis*, um peixe de importância econômica e ecológica popularmente conhecido como dourado e cujas populações naturais foram reduzidas nos últimos anos. O Rio Uruguai representa uma área sujeita a uma intensa pressão ambiental causada por barragens hidrelétricas, que restringem tanto o movimento a montante para áreas de desova quanto o movimento passivo a jusante de ovos e larvas para áreas de berçário e recrutamento. Certamente, a presença de barragens no alto Uruguai poderia sugerir a existência de estruturação espacial. No entanto, uma evidência genética previamente descrita de isolamento temporal sugere a hipótese da presença de cardumes reprodutivos, temporalmente diferentes que podem apresentar assinaturas genéticas desse isolamento. Utilizando uma abordagem de Genotipagem por Sequenciamento (GBS), foram avaliados marcadores de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) para 60 indivíduos de *S. brasiliensis*. Padrões de estrutura genética foram inferidos usando três tipos de marcadores: (i) SNPs totais, (ii) SNPs supostamente neutros e (iii) supostos SNPs adaptativos e três conjuntos de indivíduos: (i) total de indivíduos, (ii) Itá e (iii) Turvo, com a finalidade de testar a existência do padrão de Isolamento por tempo descrito em *S. brasiliensis*. Análises de agrupamento usando os marcadores totais e neutros negam a hipótese de isolamento temporal e sugerem um cenário de panmixia entre dourados das duas regiões. Em contrapartida, 121 supostos SNPs adaptativos evidenciaram quatro agrupamentos. Esses resultados indicaram que a seleção pode estar impulsando a diferenciação genética nos dourados de ambas regiões, resultando em uma “Seleção divergente temporal” com a formação de dois potenciais ecótipos de *S. brasiliensis*: “Early” e “Late” que desovam no início (outubro-dezembro) e no final (janeiro-fevereiro) da estação reprodutiva, respectivamente. Os SNPs adaptativos mapeados em um genoma de referência anotado, foram identificados apenas em genes envolvidos em funções em nível celular. Assim, foi sugerido que nossos marcadores SNP exibem um efeito de “carona genética” com regiões genômicas que estão realmente sob seleção, com a provável existência de “ilhas genômicas” moldando a estrutura genômica de *S. brasiliensis* durante os estágios iniciais de divergência ecológica sob altos níveis de fluxo gênico. No geral, este estudo demonstra a utilidade das abordagens genômicas aplicando a análise da suposta variação genética adaptativa quando dados neutros falham em revelar padrões de estrutura populacional em espécies de peixes migratórios. No entanto, estudos adicionais incluindo variação fenotípica e dados ecológicos são necessários para auxiliar a identificação de unidades de manejo que garantam o status de conservação de *S. brasiliensis* do alto e médio rio Uruguai.

**Palavras-chave:** Isolamento por tempo; GBS; migrações reprodutivas; unidades evolutivas; unidades de exploração.

## ABSTRACT

The Neotropical region is recognized by its high biodiversity, from which Ostariophysian fish represent a group of wide diversifications. Among these fish, those that carry out long-distance migratory movements, that occur naturally during annual reproduction seasons in tropical basins, stand out. There is still much to investigate about how this behavior is reflected in the genetic structure of migratory freshwater fish, such as *Salminus brasiliensis*, a fish of economic and ecological importance popularly known as Dourado and whose natural populations have been reduced in the last years. Uruguay River represents an area subjected to intense environmental pressure caused by hydroelectrical dams, which constrain both the upstream movement to spawning areas and the passive downstream movement of egg and larvae to nursery and recruitment areas. Although the presence of dams could suggest the existence of a spatial population structure, previous genetic evidence of isolation by time suggests the hypothesis of the presence of reproductive shoals temporally different that could present genetic signatures of this isolation. Using a Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach, Single Nucleotide Polymorphisms markers for 60 individuals of *S. brasiliensis* were assessed. Patterns of genetic structure were inferred using three datasets: (i) Total SNPs, (ii) putative neutral SNPs, and (iii) putative adaptive SNPs, and three sets of individuals: (i) Total individuals, (ii) Itá e (iii) Turvo, in order to test the pattern of Isolation by time described for *S. brasiliensis*. Clustering analysis using the total and putative neutral SNPs datasets rejected the hypothesis of isolation by time and suggest that dourados from both regions represent a panmictic population. In contrast, 121 putative adaptive SNPs evidenced four genetic clusters. These findings indicated that selection would drive a genetic differentiation between dourados from the upper and middle Uruguay river, resulting in a “Temporal divergent selection” with the formation of two potential ecotypes of *S. brasiliensis*: “Early” and “Late ” spawners, at the beginning (October-December) and at the end (January-February) of the reproductive season, respectively. By mapping our adaptive SNPs to an annotated genome assemble, those were identified in genes involved in functions at cellular level. Thus, it was suggested that our SNP markers exhibit an effect of “genetic hitchhiking” with genomic regions that are truly under selection, with the probable existence of “genomic islands” shaping the genomic structure of *S. brasiliensis* during initial stages of ecological divergence under high levels of gene flow. Overall, this study demonstrates the utility of genomic approaches by applying analysis of putative adaptive genetic variation when neutral data fail in revealing patterns of population structure in freshwater migratory fish species. Nevertheless, further studies including both phenotypic and ecological data are necessary to aid to identify management units that guarantee the conservation status of *S. brasiliensis* from the upper and middle Uruguay River.

**Key-words:** Isolation by time; GBS; Spawning migrations; Evolutive units; Management units.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Área de estudo com os pontos de amostragem selecionados por Ribolli *et al.* (2017) nas bacias alta e média do rio Uruguai, Brasil..... 24
- Figura 2.** Análises de estrutura genética usando SNPs totais (9 004/16 111 SNPs). A: gráfico de barras no STRUCTURE (K= 5) e B: eixos um e dois resultantes da PCA. Indivíduos no gráfico de barras foram ordenados de acordo com o mês de amostragem. No PCA, a porcentagem da variação total explicada por cada eixo é mostrada. Cores semelhantes são usadas para destacar indivíduos coletados no mesmo mês..... 30
- Figura 3** - Análises de estrutura genética usando supostos SNPs neutros (8963/15 990 SNPs). A: gráfico de barras no STRUCTURE (K= 3) e B: eixos um e dois resultantes da PCA. Indivíduos no gráfico de barras foram ordenados de acordo com o mês de amostragem. No PCA, a porcentagem da variação total explicada por cada eixo é mostrada..... 31
- Figura 4** - Análises de estrutura genética usando supostos SNPs adaptativos (59/121 SNPs). A: gráfico de barras no STRUCTURE (K= 4) e B: eixos um e dois resultantes da PCA. Indivíduos no gráfico de barras foram ordenados de acordo com o mês de amostragem..... 32
- Figura 5** - Análises de estrutura genética usando o painel de supostos SNPs adaptativos (55/70 SNPs) para indivíduos de Itá A: Gráfico de barras obtido em STRUCTURE para indivíduos do ponto de Itá. B: B: eixos um e dois resultantes da PCA..... 33
- Figura 6** - Análises de estrutura genética usando o painel de supostos SNPs adaptativos (23/29 SNPs) para indivíduos de Turvo. A: Gráfico de barras obtido em STRUCTURE para indivíduos do ponto de Itá. B: B: eixos um e dois resultantes da PCA..... 33

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Pontos de amostragem usados por Ribolli <i>et al.</i> (2017) para a análise de estruturação populacional na época de desova de <i>S. brasiliensis</i> do ano hidrológico 2010-2011 (N: número de amostras).....	22
<b>Tabela 2.</b> Nº SNPs supostamente adaptativos e supostamente neutros estimados para cada conjunto de dados usando o pacote pcadapt v.4.....	27
<b>Tabela 3</b> - Parâmetros de diversidade genética calculados para as 3 agrupações analisadas do dourado <i>S. brasiliensis</i> no alto e médio rio Uruguai (N = número de indivíduos, Ho = Heterogozidade observada, He = Heterogozidade esperada, Fis = Coeficiente de endogamia).....	28
<b>Tabela 4</b> - Genes onde ocorreram nossos supostos SNPs adaptativos (Em negrito: SNPs mapeados em regiões CDS) .....	33

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	10
I.1 Reprodução de peixes neotropicais migradores.....	10
I.2 Estruturação em peixes migradores neotropicais.....	11
I.3 A diversidade genética como ferramenta para estudos de conservação .....	13
I.4 O rio Uruguai: generalidades .....	15
I.5 <i>Salminus brasiliensis</i> no alto e médio rio Uruguai .....	17
II. JUSTIFICATIVAS PARA O ESTUDO.....	20
III. OBJETIVOS E HIPÓTESES .....	22
III.1 Objetivo principal .....	22
III.2 Objetivos específicos .....	22
III.3 Hipóteses .....	22
IV. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
IV.1 Extração do DNA total.....	23
IV.2 Construção das bibliotecas de SNPs.....	23
IV.3 Filtragem dos loci .....	24
IV.4 Identificação de SNPs sob seleção.....	25
IV.5 Análises de diversidade e estrutura genética .....	26
IV.6 Identidade de SNPs sob seleção.....	26
V. RESULTADOS.....	27
V.1 Filtragem dos loci .....	27
V.2 SNPs sob seleção para cada conjunto de dados .....	28
V.3 Análises de diversidade e estrutura genética .....	28
V.4 Identidade de SNPs sob seleção.....	29
VI. DISCUSSÃO .....	38
VI.1 Diversidade do dourado <i>Salminus brasiliensis</i> .....	38
VI.2 Evidência de subestrutura populacional .....	39
VI.3 Identidade dos supostos SNPs adaptativos.....	41
VI.4 IBT ou ABT em <i>Salminus brasiliensis</i> ? .....	43
VI.5 Considerações finais .....	45
VII. CONCLUSÕES.....	47
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
IX. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	59

## I. INTRODUÇÃO

### I.1 Reprodução de peixes neotropicais migradores

A reprodução dos peixes consiste em estratégias que garantem o sucesso e a sobrevivência da progênie. Por exemplo, existem espécies que produzem um pequeno número de ovos adaptados para uma alta sobrevivência, ou que produzem uma grande quantidade de pequenos ovos com baixa sobrevivência, mas suficientes para absorver o risco (Garrod & Horwood, 1984). Existem também espécies que desovam uma vez em sua vida e morrem, espécies que podem desovar muitas vezes ou que só têm uma única desova, que varia de acordo com a sazonalidade; como acontece em peixes neotropicais que fazem longas migrações (entre os meses de setembro e novembro) rio acima até os locais de desova (Lowe-McConnell, 1975; Zaniboni-Filho & Schulz, 2003).

Fatores como inundações sazonais e a precipitação atuam como estímulo para o início da maturação (Lowe-McConnell, 1975; Bye, 1984), ocorrendo a migração às cabeceiras dos rios e a desova (Vazzoler *et al.*, 1996; Reynalte-Tataje *et al.*, 2012). De tal maneira, a reprodução em peixes potamódromos é resultado da interação entre fatores abióticos (exógenos) e bióticos (endógenos) (Stacey, 1984), e condicionada principalmente pela natureza dos locais de desova, sua acessibilidade e adequação para o desenvolvimento dos ovos e larvas (Lowe-McConnell, 1975; Pelicice & Agostinho, 2008). Portanto, a migração exerce um papel fundamental no êxito reprodutivo, pois permite a procura desses ambientes.

Em rios Neotropicais, a migração de peixes está sujeita à intensa pressão ambiental causada pelos projetos hidrelétricos (Winemiller *et al.*, 2016). A construção de barragens tem efeitos negativos nos ecossistemas lóticos, fragmentando o ambiente e promovendo inundações das margens dos rios (Pompeu & Godinho, 2006), que resultam na formação de represas que promovem a proliferação de algas nocivas (Sotero-Santos *et al.*, 2008; O'Farrell *et al.*, 2012), a redução nas taxas de concentração de oxigênio dissolvido, o acúmulo de sedimentos (Mounic-Silva *et al.*, 2019) e a facilitação da invasão aquática de espécies exóticas, que afetam a assembleia de peixes migradores (Gois *et al.*, 2015).

Embora as represas ofereçam áreas de alimentação que permitem o estabelecimento de espécies oportunistas e o rápido crescimento de espécies

pequenas (Schork, 2016), adaptações para a desova são mais difíceis em espécies migratórias devido às alterações de fatores ambientais que estão intrinsecamente ligados ao ciclo de vida dos peixes, impactando o normal desenvolvimento das gônadas, a maturação sexual e a desova, e assim ameaçando a reprodução (Lowe-McConnell, 1975). Certamente, o grau de interferência de um reservatório depende basicamente de sua posição em relação às áreas críticas do ciclo de vida dos peixes (locais de desova, berçários e áreas de alimentação) (Agostinho *et al.*, 2002).

Em organismos aquáticos, o grau de diferenciação entre eles depende de fatores que levam as populações a homogeneidade ou a heterogeneidade genética (Hamoy *et al.*, 2018). Por exemplo, Cataldo *et al.* (2020) estudaram os efeitos da UHE Salto Grande (que divide as bacias do baixo e médio Uruguai) na reprodução de espécies de peixes migratórias entre 2009 e 2016. Suas análises de ictioplâncton demonstraram que as populações de peixes estavam fragmentadas, provando a existência de duas áreas diferentes de reprodução: uma a montante e outra a jusante da UHE, sugerindo um cenário de estruturação populacional produto do represamento.

## **I.2 Estruturação em peixes migradores neotropicais**

A estruturação de uma população é um componente comum da variação genética de uma espécie e tem importância em várias áreas de aplicação, como a genética evolutiva e genética da conservação (Liu *et al.*, 2020). Para uma espécie de peixe, por exemplo, distribuída em uma ou muitas bacias, a estrutura genética é validada segundo a intensidade do fluxo gênico entre suas populações (Hamoy *et al.*, 2018). Dada sua grande capacidade migratória, as espécies de peixes neotropicais podem constituir uma população homogênea (panmítica), com altos valores de diversidade genética (Ribolli *et al.*, 2021). No entanto, existem mecanismos que podem permitir à estruturação genética.

Para espécies que ocupam ambientes contínuos ou parcialmente contínuos, as diferenças genéticas muitas vezes estão relacionadas em função da distância espacial que separa as áreas de reprodução, um padrão conhecido como isolamento por distância (IBD, siglas em inglês) (Coulson *et al.*, 2006). De forma similar, o isolamento espacial causado por barreiras geográficas históricas pode também resultar na diferenciação genética populacional (Ribolli *et al.*, 2021).

Por outro lado, as diferenças no tempo de reprodução também podem limitar o fluxo gênico de maneira análoga ao isolamento por distância. Nesse caso, se o tempo de desova é significativamente hereditário, então este pode contribuir para o isolamento (Hendry & Day, 2005). Esse comportamento, chamado “Isolamento por tempo” (IBT, siglas em inglês), foi primeiramente descrito para os peixes da família Salmonidae (Hendry & Day, 2005) e tem sido estendido para estudos de estruturação genética em outros peixes anádromos (Coulson *et al.*, 2006) e potamódromos (Rueda *et al.*, 2013; Braga-Silva & Galetti, 2016; Ribolli *et al.*, 2017; Da Rosa *et al.*, 2022).

Independentemente da causa, é necessário o entendimento da estrutura e conectividade genética de uma espécie antes de fazer estudos mais sofisticados. Por exemplo, no momento de inferir tempos de divergência entre duas populações, é necessário saber se as duas populações existem e quais indivíduos pertencem a cada uma (Liu *et al.*, 2020). Adicionalmente, a compreensão das diferenças genéticas em populações nativas de peixes é fundamental para o manejo de recursos pesqueiros a longo prazo. (Ramella *et al.*, 2006). Populações geneticamente diferenciadas podem ser consideradas como diferentes unidades de exploração ou manejo, podendo responder de maneira distinta às condições ambientais, à pressão da pesca (Zhang *et al.*, 2020) e servir como fonte de variação genética para outras populações (Piorsky *et al.*, 2008).

Nesse caso, se o intercâmbio de genes pela migração em uma população sob a pressão de pesca é limitado, a possibilidade de sua recuperação é pequena (Hiltsdorf *et al.*, 2006) e, dado que muitas espécies de peixes migradores são componentes principais dos desembarques pesqueiros (especialmente, gêneros *Prochilodus*, *Salminus*, *Brycon*) (Di Persia *et al.*, 1986), é fundamental considerar a estrutura genética na avaliação do estoque de peixes, pois a negligência das estruturas populacionais na gestão da pesca pode causar riscos inesperados de superexploração (Ying *et al.*, 2011).

Assim, métodos baseados na genética têm sido aplicados para facilitar o manejo da pesca (Shaklee *et al.*, 1999). No entanto, abordagens tradicionais baseadas em dados genéticos insuficientes de regiões genômicas estreitas resultam ineficazes quando: (1) as populações divergem recentemente ou (2) as populações apresentam altos níveis de fluxo gênico. (Carvalho, 1994; Russello *et al.*, 2011). Na atualidade, avanços recentes no campo da genômica populacional superaram essas

limitações (Zhang *et al.*, 2020), permitindo um estudo profundo da diversidade genética em peixes.

### **I.3 A diversidade genética como ferramenta para estudos de conservação**

Nas últimas décadas, novas técnicas de genética molecular tiveram impactos relevantes nos campos da ecologia, evolução e conservação (Morin *et al.* 2004). A utilização de marcadores moleculares que revelam polimorfismo ao nível do DNA tem desempenhado um papel cada vez maior nos estudos de genética animal, sendo capaz de mensurar de maneira precisa o grau de variação genética em populações aquáticas e primordiais para a elaboração de estratégias de manejo sustentável e conservação. Infelizmente, as preocupações geralmente estão mais direcionadas na percepção do desaparecimento de uma espécie do que a perda de sua diversidade genética (Hamoy *et al.*, 2018).

A diversidade genética é um componente importante da biodiversidade e pode ser definida como a quantidade de variação genética entre indivíduos, o que permite às populações evoluírem em resposta às mudanças ambientais, deriva genética, mutação, seleção natural e eventos históricos. (Hamoy *et al.*, 2018). Assim, a diversidade genética em peixes de água doce pode ser medida pelo número de alelos e pela heterozigosidade de um marcador molecular em uma população (Juanes *et al.*, 2007), onde os marcadores de DNA microssatélites têm sido os mais utilizados (Vignal *et al.* 2002) e mais descritos para espécies aquáticas (Hamoy *et al.*, 2018).

Marcadores microssatélites, também conhecidos como repetições de sequência simples (SSR, siglas em inglês), foram descobertos na década de 1980 e rapidamente foram aplicados como um dos marcadores genéticos mais usados em estudos moleculares, ecologia e evolução (Morin *et al.* 2004). Eles tendem a ser altamente polimórficos, estão distribuídos de maneira uniforme por todo o genoma e localizados em regiões não codificantes. Adicionalmente, os microssatélites são bastante informativos dado que apresentam uma alta taxa de mutação variável em diferentes locos, que permitem responder perguntas no nível da população (Morin *et al.* 2004; Zimmerman *et al.* 2020).

Estudos usando marcadores moleculares microssatélites têm sido aplicados na identificação da diversidade e estruturação genética de espécies de peixes neotropicais (Carvalho-Costa *et al.*, 2008; Sanches *et al.*, 2012; Orozco &

Narváez, 2014). No entanto, sua alta taxa de mutação pode levar a uma subestimação da heterozigose por homoplasia (Coates *et al.* 2009; Zimmerman *et al.* 2020), o que impõe severas limitações na análise de dados subsequentes (Morin *et al.* 2004). Além disso, locos microssatélites sofrem pela presença de alelos nulos e padrões de mutação que são variáveis, introduzindo ambiguidade nas análises de dados. Os loci também podem ser esparsos no genoma e, para algumas espécies, difíceis de serem identificados (Navajas *et al.* 1998; Morin *et al.* 2004).

Por outro lado, o polimorfismo de único nucleotídeo (SNP, em inglês) é um local na sequência de DNA onde os indivíduos variam em um único nucleotídeo (Zimmerman *et al.* 2020) e é a forma mais comum de variação genética no genoma. (Liao & Lee, 2010). Em palavras simples, é uma diferença de base de nucleotídeo individual entre duas sequências de DNA que podem ser categorizadas de acordo com a substituição de nucleotídeo como transições (C/T ou G/A) ou transversões (C/G, A/T, C/A ou T/G) (Edwards *et al.* 2007). Na prática, alguns autores consideram indels de um par de bases (inserções ou deleções) como SNPs (Liao & Lee, 2010), embora estes ocorram por mecanismos diferentes (Vignal *et al.* 2002).

Em comparação aos microssatélites, os SNPs têm menor diversidade (geralmente, são marcadores bi-alélicos) e fornecem menos poder estatístico para discriminar genótipos únicos em comparação aos loci microssatélite (Coates *et al.* 2009). Não obstante, uma importante vantagem de usar muitos SNPs reside em uma amostra mais representativa de todo o genoma (Edwards *et al.* 2007), redução da variância de amostragem interlocos e uma oportunidade para identificar locos sob seleção (“outliers loci”). (Morin *et al.* 2004).

Como resultado, sua distribuição tanto em regiões codificantes como não codificantes os torna úteis para estudos populacionais e de mapeamento (Xing *et al.* 2005; Coates *et al.* 2009) e, como resultado de sua densa prevalência no genoma e seu potencial para atingir regiões funcionais, prevê-se que os SNPs substituam microssatélites para estudos de caracterização genética (Landegren *et al.* 1998, Seddon *et al.* 2005, Morin *et al.* 2009). Além disso, diferentemente dos microssatélites, os SNPs possuem um mecanismo mutacional bem compreendido com baixos níveis de homoplasia (Seddon *et al.* 2005; Zimmerman *et al.* 2020).

Outros benefícios dos marcadores baseados em SNP incluem a aplicabilidade universal de chamadas de sequência de nucleotídeos entre laboratórios e flexibilidade nos protocolos de detecção (Coates *et al.* 2009). Ao contrário, a repetibilidade da genotipagem de microssatélites entre laboratórios pode ser um desafio (Zimmerman *et al.* 2020). Assim, os marcadores SNPs podem ser replicados e executados em paralelo entre diferentes laboratórios, e os resultados comparados, diretamente sem ajuste dos dados brutos.

No passado, as técnicas de sequenciamento limitavam-se a certos grupos taxonômicos de “espécies modelos” ou espécies bem estudadas (Robledo *et al.*, 2018); mas agora as novas tecnologias de sequenciamento de larga escala (NGS) permitem o estudo de todo o genoma para a identificação de SNPs que facilitam a exploração da diversidade intraespecífica (Elshire *et al.*, 2011), seja por meio da geração e aplicação de matrizes de SNPs ou por técnicas de genotipagem por sequenciamento (GBS, Davey *et al.* 2011).

O uso da genotipagem por sequenciamento (GBS) tem permitido a caracterização e mapeamento de genes e o estudo da identificação de estoques, evolução, especiação ecológica e genética populacional (Li & Wang, 2017). Esse método tem sido aplicado ao estudo de muitos grupos animais, incluindo espécies de peixes marinhos (Sherman *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023) e de água doce (Skovrind *et al.* 2015; Mastrochirico-Filho *et al.*, 2019; Torati *et al.*, 2019; Lujan *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2022), oferecendo novas interpretações sobre a diversidade e estruturação genética de espécies importantes nas áreas de pesca e aquicultura (Rasal *et al.*, 2017; Li & Wang, 2017; Robledo *et al.*, 2018).

#### **I.4 O rio Uruguai: generalidades**

Localizado na região sul do Brasil, o rio Uruguai nasce nas Serra do mar e Serra Geral da confluência dos rios Canoas e Pelotas; percorrendo um total de 2262 km e cobrindo uma área de 365 000 km<sup>2</sup> correspondentes ao sul do Brasil, nordeste da Argentina e oeste de Uruguai (Silva, 2014; Iriondo & Kröhling, 2022); sendo uma das redes fluviais fundamentais para a ocupação humana do sudeste da América do Sul. (Castro, 2019). Sua bacia é a segunda mais importante dentro do sistema da Prata-Uruguai-Paraná-Paraguai, o segundo maior sistema de drenagem da América do Sul (3 200 000 km<sup>2</sup>) e do planeta (Lowe-McConnell, 1975; Castro, 2019).

De acordo com Iriondo & Kröhling (2022), as barreiras físicas permitem separa-la em três: uma bacia superior que vai das nascentes até o rio Aguapeí (Corrientes, Argentina), uma bacia média que vai até o córrego Molino (Entre Rios, Argentina) e uma bacia abaixo deste até desembocar no estuário do rio da Prata (Castro, 2019). Também, segundo seu percurso natural, o rio Uruguai pode dividir-se de acordo com as duas barreiras naturais presentes: o Salto de Yucumã no Parque estadual Turvo, separando as regiões do alto e médio Uruguai; e Salto Grande (na atualidade, representada pelo reservatório e UHE Salto Grande), que divide as regiões média e baixa (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003; Mounic-Silva *et al.*, 2019).

Segundo o gradiente latitudinal, as bacias alta e meia correm em latitudes subtropicais, e a bacia baixa, em latitudes temperadas (Reynalte-Tataje *et al.*, 2012); apresentando assim diferentes características ao longo de seu percurso. Certamente, a região sul do Brasil (Santa Catarina e Rio Grande do Sul) localiza-se em uma área de transição e, portanto, apresenta um clima tipo Subtropical úmido que é controlado pela ação de massas de ar de origem tropical (MTA, MTC) e polar (MPA) (Mendonça & Moresco, 2007).

Uma característica importante dessa interação atmosférica é a maior regularidade da distribuição anual pluviométrica (embora com valores inferiores aos da Amazônia), com chuvas relativamente bem distribuídas ao longo do ano (251 mm mensais) (Monteiro 2001; Sartori, 2003; Zaniboni-Filho & Schulz, 2003; Mendonça & Moresco, 2007). A variabilidade térmica, contrariamente, é bastante acentuada, com maiores picos de temperatura no verão (Mendonça & Moresco, 2007). Esse cenário distingue-o das bacias dos rios Paraná (Alto Paraná) e Paraguai (Região do Pantanal) no território brasileiro (Lowe-McConnell, 1975; Di Persia *et al.*, 1986), os quais se localizam em latitudes tropicais com um tipo de clima basicamente quente e úmido ao longo do ano (Agostinho *et al.*, 2004).

Todo o descrito corresponde a condições normais; mas períodos de muitas chuvas e aumento na temperatura da água, como os de pequenas estiagens podem ser intensificados em função da atuação dos fenômenos “El Niño” e “La Niña”, respectivamente (Monteiro, 2001) sobre a região sul.

Como resultado, a bacia alta do rio Uruguai é considerada um importante centro de biodiversidade do Sul do Brasil, com muitas espécies endêmicas (Paim &

Ortiz, 2006, citado por Silva, 2014). Com aproximadamente 400 km de percurso, caracteriza-se por ter um forte gradiente topográfico, o que propicia um grande potencial de geração de energia elétrica; isso é representado pela quantidade de usinas hidroelétricas instaladas ao longo de seu percurso nos últimos 25 anos (Itã, Machadinho e Foz de Chapecó, principalmente) (Reynalte-Tataje *et al.*, 2012; Silva, 2014; Mounic-Silva *et al.*, 2019).

No caso do médio Uruguai, essa região assume a condição de fronteira e é descrita como um cenário diferente: com um longo trecho fluvial de mais de 800 km sem barragem ou barreira geográfica significativa que pudesse restringir a movimentação de peixes; incluindo muitas áreas de várzea, lagoas marginais e pântanos (Mounic-Silva *et al.*, 2019); sendo uma área crítica para a reprodução devido à integridade dos habitats o qual garanta a reprodução de peixes migratórios (Soares *et al.*, 2022).

### **1.5 *Salminus brasiliensis* no alto e médio rio Uruguai**

*Salminus brasiliensis* (Cuvier 1816) é uma espécie potamódroma da família Bryconidae que ocorre em rios da América do Sul, desde o Rio da Prata nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai, até as bacias do Alto Rio Chaparé e Mamoré e na Lagoa dos Patos (Froese & Pauly, 2023). Muito apreciada por seu tamanho, agressividade e voracidade; é uma espécie de importância ecológica nos ecossistemas lóticos (Zaniboni-filho *et al.*, 2017), e de importância econômica, sendo uma das mais procuradas pelos pescadores, tanto na pesca esportiva (Lowe-McConnell, 1975) como profissional (Carolsfeld *et al.*, 2003), com viável potencial para seu uso na piscicultura (Zaniboni-filho *et al.*, 2017).

Sendo descrito como um peixe de “piracema”, o dourado faz migrações reprodutivas rio acima no período das cheias, como muitos peixes Characiformes (Lowe-McConnell, 1975), e migrações tróficas rio abaixo (De Carvalho, 2010); alcançando distâncias entre 100 e 500 km (Bonetto *et al.*, 1971) e podendo recorrer de 1000 a 1440 km (Sverlij & Espinach Ros, 1986). No entanto, a viabilidade das suas populações naturais é fortemente afetada pela pesca predatória, poluição, destruição de habitats, introdução de espécies exóticas e a construção de barragens (Agostinho *et al.*, 2002). Como resultado, está documentado o declínio populacional de dourados na bacia do Alto Paraná (Abilhoa & Duboc, 2004), no estuário da Prata na Argentina (Zayas & Cordiviola, 2007); nos rios Grande, Tietê e Paranapanema no estado de São

Paulo (Rosa & Lima, 2008), no Rio Grande do Sul e na bacia do rio Uruguai (Marques *et al.*, 2002; Ribolli *et al.*, 2021).

No alto rio Uruguai, a construção das UHEs Itã e Machadinho nos anos 1996 e 1998, respectivamente, motivou a pesquisa da biologia do dourado. Os primeiros estudos feitos por Machado (2003) correspondem a descrições macro e microscópicas em gônadas, câmbios na relação gonadosomática (RGS) e na frequência de indivíduos maduros em função de variáveis ambientais entre 1998 e 2002. Nesse trabalho, o dourado é descrito como uma espécie reofílica, com desenvolvimento sincrônico de suas células reprodutivas, de desova total e com um período reprodutivo desde a primavera (setembro e outubro) até o verão no mês de março; com picos de RGS entre os meses de dezembro e fevereiro. Além disso, nota-se que as maiores precipitações (e portanto, as maiores enchentes) foram registradas antes do período reprodutivo; mas a maturação final e a desova, nos meses de maior temperatura.

No entanto, em seu estudo, foram também observados: (1) indivíduos em maturação em todos os meses do ano, (2) indivíduos maduros-esvaziados e aumentos na RGS durante o inverno (julho – agosto) e (3) picos de chuvas entre janeiro e abril; cenários que podem sugerir a extensão da sua temporada reprodutiva. Anos depois, a evidência de um longo período reprodutivo seriam descritas por Zaniboni-Filho *et al.* (2017); que trabalhou com data em uma escala de 18 anos (1996 – 2014); descrevendo um amplo período reprodutivo, no qual a maior frequência de chuvas antes da primavera/verão pode estimular sua migração reprodutiva; com ocorrência de peixes maduros entre os meses de agosto e março e indivíduos desovados entre julho e maio.

É importante sinalizar que a presença de reprodutores maduros e desovados não é um indicador confiável do sucesso reprodutivo (Machado, 2003). Portanto, estudos da comunidade de ictioplâncton tiveram início nos anos 2001 e 2002, feitos por Hermes-Silva *et al.* (2009) e Reynalte-Tataje *et al.* (2012); no quais foi monitorada a presença de ovos e larvas de diferentes taxas, tanto no rio principal (Uruguai) como nas regiões tributárias (Chapecó, Palomas e Ligeiro). Apesar da quase nula presença de *S. brasiliensis* no rio principal, os autores puderam identificar os tributários como áreas alternativas para a desova; sobretudo em espécies

pequenas e medianas; onde a atividade reprodutiva (presença de ictioplâncton) teve uma correlação positiva com a temperatura e fluxo da água.

Estudos similares foram feitos por Correa (2008) entre 2005 e 2006 nos rios tributários Chapecó, Ligeiro e Peixe, os quais foram indicadas como possíveis áreas de recrutamento para peixes. Novamente, não foi registrada a presença de *S. brasiliensis*, embora Zaniboni-Filho (2002) tenha registrado indivíduos maduros nas regiões estudadas. Além disso, foram registradas densidades de ovos e larvas similares às do estudo conduzido por Hermes-Silva *et al.* (2009); assim como a mesma correlação com valores de temperatura e fluxo da água.

Os primeiros registros de ictioplâncton do dourado viriam à luz no trabalho de Reynalte-Tataje *et al.* (2012b), no qual os autores fizeram um monitoramento na escala de dez anos (2000-2010) para 3 espécies migratórias: *Salminus brasiliensis*, *Prochilodus lineatus* e *Steindachneridion scriptum* em um trecho lótico não maior a 10 km entre as Usinas Machadinho e Itã e o rio Ligeiro (tributário); encontrando ovos em estágios iniciais das duas primeiras espécies na região tributária e só uma pequena quantidade de ovos em estágio final de *S. scriptum* no rio principal. Além disso, foi observada a presença de ictioplâncton de espécies migratórias durante períodos reprodutivos com a ocorrência de “El Niño” moderado e a presença da Zona de Convergência do Atlântico Sul (ZCAS) sobre a região; este último, responsável por aumentar significativamente as chuvas quando se desloca mais ao sul (Nery, 2005).

Para todas as pesquisas comentadas, a área da Foz de Chapecó foi reconhecida como uma importante área de desova para espécies pequenas, medianas e algumas espécies migratórias (*Prochilodus lineatus*) (Hermes-Silva *et al.*, 2009). No entanto, esse panorama provavelmente se alterou com a construção da UHE Foz de Chapecó em 2007 e início de atividades em 2010. Assim, são escassas as áreas de reprodução documentadas para a região alto do rio Uruguai. Para o médio rio Uruguai, Soares *et al.* (2022) descreve potenciais áreas berçário para o recrutamento de peixes, destacando a importância dessa região para a conservação de espécies reofílicas diante do perigo do estabelecimento de novos projetos hidrelétricos.

## II. JUSTIFICATIVAS PARA O ESTUDO

A presença de barragens tanto naturais (Salto de Yucumã) como artificiais (UHE Itã, Machadinho e Foz de Chapecó) na bacia do rio Uruguai poderia sugerir a existência de estruturação espacial. Assim, Ribolli *et al.* (2017) estudaram 317 indivíduos de *S. brasiliensis*, no período reprodutivo 2010-2011 com a finalidade de encontrar sinais de subestruturação espacial porém, em vez disso, identificou a presença de 3 grupos reprodutivos temporais geneticamente diferentes dentro da mesma temporada de desova, sugerindo o mecanismo de isolamento temporal (Hendry & Day, 2005); onde as diferenças no tempo de desova pode limitar o fluxo gênico, resultando em subpopulações geneticamente distintas (Coulson *et al.*, 2006).

O isolamento por tempo pode permitir a adaptação de organismos a condições ambientais específicas em momentos reprodutivos específicos (Adaptação por tempo - Hendry & Day, 2005); que determinam as características fenotípicas que permitem aos indivíduos lidar e se adaptar a ambientes específicos (Mariani & Bekkevold, 2013). Essa proposição é complementada pelos achados de Reynalte-Tataje *et al.* (2012), que encontraram relação entre a presença de ovos e larvas de *S. brasiliensis* e *Prochilodus lineatus* em temperaturas acima de 22° C e vazões de água acima de 100 m<sup>3</sup>/s, sugerindo que a desova do dourado no alto rio Uruguai ocorreria justamente, sob condições ambientais muito específicas.

Diferentemente do período de reprodução prolongado descrito para os peixes do alto rio Uruguai (Machado, 2003; Zaniboni-Filho *et al.*, 2017), Barbieri *et al.* (2001) e Barzotto & Mateus (2017) descreveram curtos períodos de reprodução para o dourado que vive nas bacias dos rios Mogi Guaçu e Cuiabá. Mesmo na região inferior do rio Uruguai (Argentina), Sverlij & Espinach (1986) comentam irregularidades no desenvolvimento das gônadas nas fêmeas, não encontrando indivíduos maduros em períodos que, segundo Mastrarrigo (1949), os peixes estão totalmente maduros em outras regiões.

Assim, embora a desova em peixes potamódromos neotropicais geralmente coincida com períodos de inundação durante os meses mais quentes (Godoy, 1975; Rizzo & Bazzoli, 2020); parece que em *S. brasiliensis* isso varia dependendo da bacia em estudo. Na verdade, o comportamento reprodutivo dos peixes neotropicais depende inteiramente de fatores locais, regionais e latitudinais (Vazzoler 1996; Reynalte-Tataje *et al.*, 2012), com espécies que podem até

apresentar plasticidade reprodutiva, e sua época reprodutiva varia dependendo das condições ambientais (Rizzo & Bazzoli, 2020).

Segundo Mann *et al.* (1984) a plasticidade em peixes pode-se originar pela experiência evolutiva em condições flutuantes que resultam em indivíduos com um genoma com ampla variedade de expressão fenotípica. Isso permitiria atingir máxima adaptabilidade e sucesso reprodutivo sob uma ampla gama de condições ambientais. No entanto, é também muito provável que a adaptação em populações individuais em condições ecológicas específicas resulte em alterações sobre suas frequências gênicas (Mann *et al.*, 1984).

Ribolli *et al.* (2017) encontraram evidência genética de IBT trabalhando com 11 marcadores microssatélites; os quais são reconhecidos como marcadores neutros (Silliman, 2019) e têm sido amplamente usados para a realização de estudos de diversidade e estruturação genética, principalmente em populações naturais (Seeb *et al.*, 2011). Em contrapartida, os SNPs são marcadores bem distribuídos ao longo do genoma e que podem estar associados a regiões codificantes influenciadas pela seleção natural (“*outliers loci*”). Nesse caso, tornam-se muito úteis para analisar a variabilidade em organismos em resposta à seleção artificial (Kong *et al.*, 2014; Mastrochirico-Filho *et al.* 2019) bem como o seu potencial adaptativo em resposta a condições ambientais (Eizaguirre & Baltazar-Soares, 2014).

Desse modo, a análise da variação genética adaptativa contida em supostos SNPs baixo seleção pode resultar em informações importantes para compreender como as condições ecológicas e o comportamento migratório podem contribuir na estrutura genética do dourado *S. brasiliensis*. Também, a aplicação de marcadores adaptativos representa uma alternativa promissora às ferramentas genéticas mais convencionais (Mariani & Bekkevold, 2013), pois podem estar diretamente ligados a regiões genéticas associadas à seleção divergente em escalas de tempo muito recentes, que podem orientar a gestão da pesca em estoques de peixes divergidos recentemente (Rusello *et al.*, 2012).

O objetivo desta pesquisa é aplicar marcadores SNPs para inferir sobre estrutura genética, descrever a diversidade genética e testar a hipótese sugerida por Ribolli *et al.* (2017), de que as populações do dourado *S. brasiliensis* estão sujeitas a

um mecanismo de segregação temporal na sua temporada reprodutiva no alto e médio rio Uruguai, podendo representar diferentes linhagens evolutivas.

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESES

#### III.1 Objetivo principal

- Identificar SNPs que estejam relacionados a regiões do genoma que expliquem o padrão temporal de desova observado em *Salminus brasiliensis* do alto e médio rio Uruguai e identificar assinaturas genéticas de potenciais locos adaptativos

#### III.2 Objetivos específicos

- Descrever a diversidade genética presente nos indivíduos de *S. brasiliensis* na bacia do alto e médio do rio Uruguai usando marcadores moleculares SNPs.
- Comparar o desempenho dos nossos marcadores SNPs e os marcadores microssatélites usados por Ribolli *et al.* (2017) na identificação de estruturação populacional dos indivíduos de *S. brasiliensis*.
- Usando os marcadores SNPs, testar o padrão de isolamento por tempo nos indivíduos de *S. brasiliensis* no alto e médio Uruguai, descrito no ano hidrológico 2010-2011 e sugerido por Ribolli *et al.* (2017) com base em marcadores microssatélites.

#### III.3 Hipóteses

- Os SNPs dentro de supostos loci adaptativos identificados neste estudo corresponderam a regiões do genoma envolvidas na maturação e desova do dourado *S. brasiliensis* do alto e médio rio Uruguai.
- Os cardumes do dourado *S. brasiliensis* estão estruturados de maneira que populações que habitam em simpatria as bacias do alto e médio rio Uruguai, podem segregar e reproduzir em diferentes momentos dentro de uma mesma temporada reprodutiva, mostrando o mecanismo chamado “Isolamento por tempo.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### IV.1 Extração do DNA total

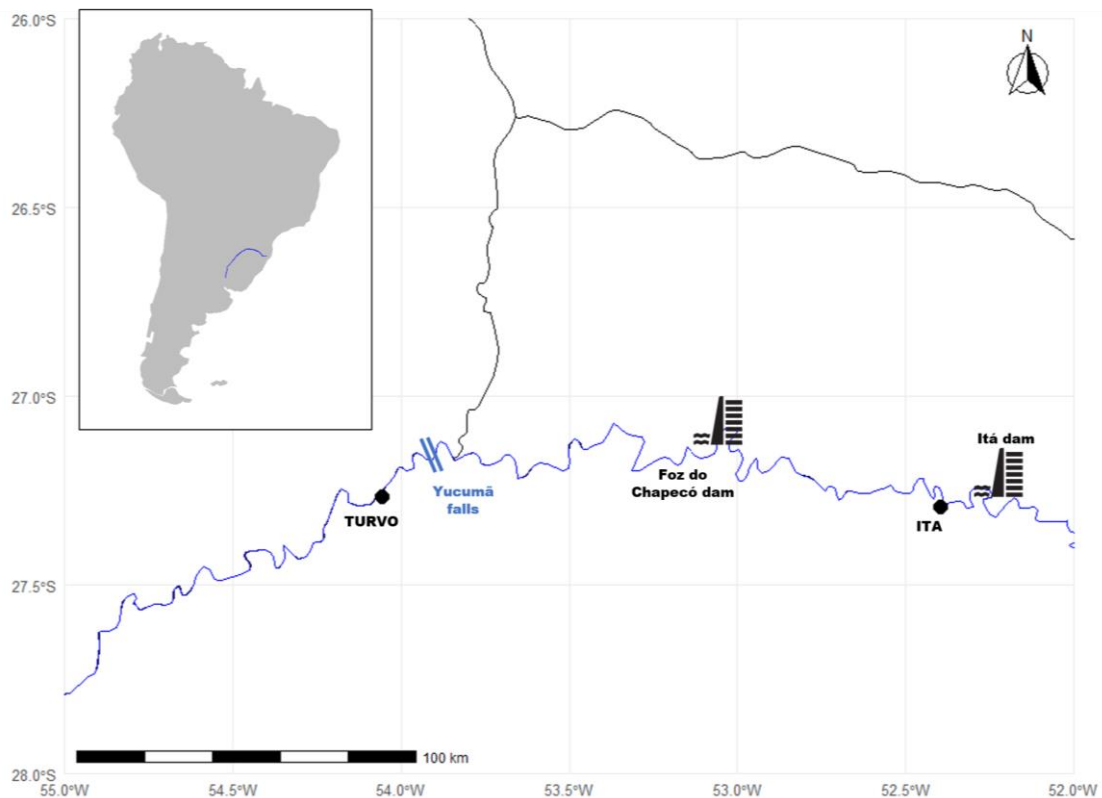
Foram escolhidas 60 amostras (ver Tabela 1, ver Figura 1) de tecidos de *S. brasiliensis* obtidas por Ribolli *et al.* (2017) durante o ano hidrológico 2010 – 2011, disponíveis no banco de tecidos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (DGE/UFSCar). O DNA total foi extraído usando o DNeasy Blood & Tissue Kit, seguindo as indicações do fabricante. Finalmente, a concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e a qualidade (A260/A280) foram avaliadas usando um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher).

**Tabela 1** - Pontos de amostragem usados por Ribolli *et al.* (2017) para a análise de estruturação populacional na época de desova de *S. brasiliensis* do ano hidrológico 2010-2011 (N: número de amostras)

Localidade	Coordenadas geográficas		Meses de amostragem	N
	Latitude	Longitude		
Ita (I)	-27.292	-52.395	Outubro 2010	10
			Novembro 2010	3
			Dezembro 2010	3
			Janeiro 2010	4
			Fevereiro 2010	10
Turvo (T)	-27.264	-54.054	Outubro 2010	10
			Dezembro 2010	5
			Janeiro 2010	5
			Fevereiro 2010	10

### IV.2 Construção das bibliotecas de SNPs

As amostras foram padronizadas para uma concentração de 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  usando um fluorômetro Qubit (Invitrogen) e normalizadas em uma placa para uma concentração final de 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . As bibliotecas de GBS foram construídas de acordo com o método descrito por Elshire *et al.* (2011) e usando a enzima *Pst*I, que demonstrou ser eficiente em peixes em geral (López *et al.*, 2022) e peixes neotropicais (Ramírez *et al.*, 2023). Os fragmentos gerados (200-450 pb) foram liofilizados a vácuo e cada indivíduo recebeu um adaptador com sequências indexadoras (barcodes) junto a um segundo adaptador comum (iniciador), que foram ligados às extremidades cortadas usando a enzima T4 DNA Ligase. O pool final foi sequenciado em uma flowcell do equipamento NextSeq2000 Illumina com o Kit P2V2 (100 ciclos - *paired-end* reads com leituras únicas de 110pb).



**Figura 1** - Área de estudo com os pontos de amostragem selecionados por Ribolli *et al.* (2017) nas bacias alta e média do rio Uruguai, Brasil.

### IV.3 Filtragem dos loci

Dados brutos recebidos em formato FASTQ foram analisados no cluster computacional do “Laboratorio de Bioinformática y Genómica para la Biodiversidad” da Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima – Perú), no pipeline Ipyrad v. 0.9.5 (Eaton & Overcast, 2020), o apresenta sete passos: classificação, filtragem, agrupamento, consenso, agrupamento e formatação. Assim, dados brutos foram demultiplexados e alinhados usando o método de montagem “*reference*” com um genoma de referência de dourado gerado por Rhie *et al.* (2021) disponível no Genbank (GCA\_030463535.1). Por fim, os dados foram classificados usando os parâmetros de qualidade em padrão e somente foram escolhidos SNPs com dois alelos.

A filtragem final foi realizada em 3 conjuntos de amostras: indivíduos totais, indivíduos de Ita e indivíduos de Turvo. O software PLINK v1.90b7.2 (Purcell *et al.* 2007) foi implementado para o controle de qualidade dos dados genotípicos, aplicando os parâmetros de “falta por marcador” (--geno 0.1), “falta por indivíduo” (--mind 0.1) e uma frequência alélica menor do 5% (--maf 0.05), nessa ordem. Além disso, dado que as seguintes análises requerem SNPs que não estão fisicamente vinculados, foi

empregada a função de “poda de variantes” (--indep-pairwise 50 2 0.2) no PLINK, que produz um subconjunto podado de marcadores que estão em desequilíbrio de ligação aproximado entre si, e um script (<https://github.com/pimbongaerts>) que reduz um arquivo VCF a um único SNP 'aleatório' por locus/chrom, onde retemos SNPs separados por pelo menos 2.500 bases (valor padrão). Assim, serão descartadas variantes que poderiam estar em desequilíbrio de ligação e aquelas que poderiam estar fisicamente ligadas, respectivamente.

#### IV.4 Identificação de SNPs sob seleção

De acordo com Funk *et al.* (2012), para a delimitação de unidades de conservação, a análise de variação genética deve ser sequencial, primeiro baseada na variação genética neutra e depois na variação adaptativa (nesse caso, a variação neutra é considerada primeiro porque está relacionada ao isolamento, Hoelzel, 2023).

Portanto, SNPs adaptativos foram estimados de forma independente usando o pacote pcadapt v.4 (Privé *et al.* 2020) no programa R v.4.3.1 (R Core Team, 2023). Nesse método, a estrutura populacional é determinada usando PCA e supõe-se que marcadores excessivamente relacionados a ela são candidatos à seleção diferencial (Luu *et al.*, 2017). Foi aplicado um valor  $\alpha$  de 0,05 (padrão = 0.1), juntamente com outras configurações padrão, e apenas os dois primeiros PCs foram analisados. Os valores de  $p$  foram ajustados usando o pacote Q-value v. 2.34.0 para a estimação da taxa de descoberta falsa (Storey *et al.*, 2023); e consideramos aqueles SNPs que apresentaram um  $q$  value  $< 0.05$  como candidatos a outliers.

Como resultado, SNPs candidatos a outliers foram organizados como o conjunto de “supostos SNPs adaptativos” e separados dos SNPs restantes, os quais foram tratados como “supostos SNPs neutros”. O objetivo de cada conjunto de dados foi testar os padrões de Isolamento por tempo (IBT) e Adaptação por tempo (ABT) propostos por Hendry & Day (2005) em peixes salmonídeos e sugeridos para *S. brasiliensis* no estudo de Ribolli *et al.* (2017); dado que Hendry & Day (2005) se concentram em marcadores supostamente neutros para o análise do IBT porque estes são mais úteis para inferir o fluxo gênico e, como os autores sugerem que a seleção também pode variar ao longo da temporada reprodutiva, nós esperamos encontrar variação adaptativa (ABT) associada ao IBT.

#### IV.5 Análises de diversidade e estrutura genética

Análises de agrupamentos foram conduzidos com a ferramenta STRUCTURE v.2.3.4 e o análise de componentes principais (PCA), no pipeline lpyrad v. 0.9.5 (Eaton & Overcast, 2020), usando os conjuntos de SNPs total, supostos SNPs neutros, e supostos SNPs adaptativos. No STRUCTURE, foi implementada uma cobertura mínima de 1.0 (mincov = 1.0, só foram usados SNPs presentes em todos os indivíduos), e para cada valor de K (2 a 6) foram realizadas 5 corridas independentes, usando 10.000 cadeias de Markov-Monte Carlo, após um período de corte inicial (burn-in) de 5.000 iterações. O valor ótimo de K foi escolhido seguindo as estimativas de  $\Delta(K)$ , segundo o método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005). No caso do PCA, apenas foram escolhidos os dois primeiros componentes principais para a detecção de estrutura genética, e foi usada a função “Nenhuma imputação”.

Considerando os clusters genéticos atribuídos pelas análises de STRUCTURE e PCA para o conjunto de dados geral, estimamos os parâmetros de diversidade genética (Heterozigosidade observada, esperada e o coeficiente de endogamia), usando o pacote dartR v.2.9.8 (Mijangos *et al.*, 2022) no programa R v.4.3.1 (R Core Team, 2023). Finalmente, foram calculados os valores de  $F_{ST}$  par a par entre os grupos genéticos sugeridos pelos dados supostamente neutros; com seus respectivos níveis de significância ( $\alpha = 0.05$ ), usando a função *stamppFst* no pacote StAMPP v.1.6.3 (Pembleton *et al.*, 2013); seguindo o método proposto por Wright (1949) e atualizado por Weir & Cockerham (1984).

#### IV.6 Identidade de SNPs sob seleção

Como a montagem do genoma do dourado (GCA\_030463535.1) é composta por contigs não anotados, a identidade dos supostos SNPs adaptativos não pôde ser determinada usando apenas o mapeamento de referência. Portanto, foi utilizado o pipeline GeMoMa v1.9 (Keilwagen *et al.*, 2019), que permite a predição de genes baseado em homologia usando a anotação de genes codificadores de proteínas em um genoma de referência para inferir a anotação de genes em um genoma alvo. Assim, olhando a informação disponível no Genbank, foram usados como referência os arquivos FNA e GFF3 de *Astyanax mexicanus* (GCF\_023375975.1), outro peixe da ordem Characiformes, e foi criado um arquivo GFF3 com uma lista de genes para o arquivo FNA de *S. brasiliensis*. Esse novo GFF3

foi usado em conjunto com nossos arquivos VCF para identificar os prováveis genes onde ocorreram nossos supostos SNPs adaptativos.

## V. RESULTADOS

### V.1 Filtragem dos loci

Foram recebidos 527 609 798 pair-end reads como dados brutos em formato FASTQ, mas durante o demultiplexing, os barcodes de uma grande quantidade dos reads do arquivo R2 não foram reconhecidos pelo pipeline (ver Tabela S1). Como resultado, somente os barcode index do 413 023 828 single-end reads (413 008 617 do R1 e 15211 do R2) foram filtrados para os 60 indivíduos de *S. brasiliensis*. Olhando o número de reads por indivíduo (ver Tabela S2), estes foram muito baixos em duas amostras (Ita\_1851 e Ita\_1879) em comparação do resto. Portanto, estas foram descartadas das filtrações posteriores. Finalizado os sete passos de pipeline Ipyrad, foram obtidos um total de 169 523 variantes em 58 indivíduos de dourado *S. brasiliensis*.

Depois da filtração no PLINK v1.9, o novo arquivo VCF obtido foi usado para conduzir primeiros testes de agrupamento. Nesta análise, duas amostras procedentes da foz do rio Turvo (Tur\_2103 e Tur\_2165), mostraram-se muito diferentes do resto (ver Figura S1). Como resultado, estas foram consideradas como indivíduos “introduzidos” e descartadas das análises. Assim, as filtrações foram corridas novamente, usando o novo número de indivíduos (56). Desse modo, 80 147 variantes foram removidas devido à falta de dados genotípicos (`---geno 0.1`), 4 indivíduos foram removidos devido à falta de dados (`--mind 0.10`) e 55 272 variantes foram removidas devido a limites de alelos menores (`--maf 0.05`). Aplicando a poda de variantes (desequilíbrio de ligação), foram retidos de 23 414 SNPs e, com o descarte de SNPs que poderiam estar fisicamente ligados, o set de dados total correspondeu a 16 111 SNPs para 52 indivíduos de *S. brasiliensis*.

No caso do ponto de amostragem de Itã (28), não foram excluídos indivíduos por falta de dados e o controle de qualidade retido 17 025 variantes. Finalmente, para o rio Turvo (28), 2 indivíduos foram excluídos por falta de dados genotípicos (`--mind`), e depois das filtrações (`--geno`, `--maf`), se retido 8 752 variantes para 26 dourados.

## V.2 SNPs sob seleção para cada conjunto de dados

A tabela 2 resume o número de variantes classificadas como “supostos SNPs adaptativos” em cada conjunto de indivíduos. Para o total de indivíduos, o pacote classificou 121 variantes como supostos SNPs adaptativos. Para indivíduos de Ita e na foz do rio Turvo, foram detectadas 70 e 29 variantes, respectivamente.

**Tabela 2.** Nº SNPs supostamente adaptativos e supostamente neutros estimados para cada conjunto de dados usando o pacote pcadapt v.4

Conjunto de dados	# de indivíduos	# de SNPs	# Loci supostamente adaptativos estimados (pcadapt)	# Loci supostamente supostos neutros
Ita e Turvo	52	16 111	121	15 990
UHE Ita	28	17 025	70	16 955
Foz do Rio Turvo	26	8 752	29	8 723

## V.3 Análises de diversidade e estrutura genética

### V.3.1 Total de indivíduos

#### V.3.1.1 SNPs totais e supostos SNPs neutros

Para as 16 111 variantes detectadas nos 52 indivíduos de dourado, as análises de agrupamento (PCA e STRUCTURE) para os conjuntos de SNPs totais e supostamente neutros não mostraram estrutura genética, nem espacial nem temporal. Da mesma forma, dados totais e supostamente neutros nas localidades de Itã e Turvo não detectaram estrutura genética (Figuras 2 e 3), nem espacial ou temporal. Em consequência, não foi estimada uma diferenciação genética ( $F_{ST}$  par a par) dado que nossos resultados de estruturação sugerem um aparente cenário de Panmixia entre dourados do alto e médio rio Uruguai, com uma baixa diferenciação genética ( $F_{ST} = 0,0007$ ) suportando nossa proposição. O resto de análises de diversidade genética mostraram altos valores de  $H_o$  (0.2751) e  $H_e$  (0.2905), como um baixo valor no coeficiente  $F_{is}$  de endogamia (0.058). Os valores são resumidos na tabela 3.

#### V.3.1.2 Supostos SNPs adaptativos

Usando o conjunto de dados supostamente adaptativos, as análises de estrutura revelaram 4 grupos (ver Figura 4). Considerando tanto o componente espacial (Itã e Turvo), e classificando temporal os indivíduos coletados nos meses de

outubro a dezembro como primeiros reprodutores (*early*), e do janeiro a fevereiro como reprodutores tardios (*late*), os grupos foram definidos como: Early Itã, Late Itã, Early Turvo e Late Turvo.

### V.3.2 Itã e Turvo

#### V.3.2.1 SNPs totais e supostos SNPs neutros

Para os 28 indivíduos coletados a jusante da Usina Itã, análises de PCA e STRUCTURE usando SNPs totais e supostos SNPs neutros também não revelaram estrutura genética. O mesmo cenário aconteceu para os 26 dourados da foz do rio Turvo, onde SNPs totais e supostos SNPs neutros não mostraram aparente estrutura genética. Na tabela 3, se apresentam os valores de diversidade genética para cada ponto correspondente, os quais foram muito similares quando comparados com os calculados no total de indivíduos.

#### V.3.2.2 Supostos SNPs adaptativos

Surpreendentemente, quando analisados separadamente indivíduos do cada ponto de amostragem, a estrutura genética usando marcadores adaptativos concordou com a observada para o total de indivíduos e foram novamente encontrados os grupos “Early” e “Late” nos dourados de Itã (Figura 5) e Turvo (Figura 6).

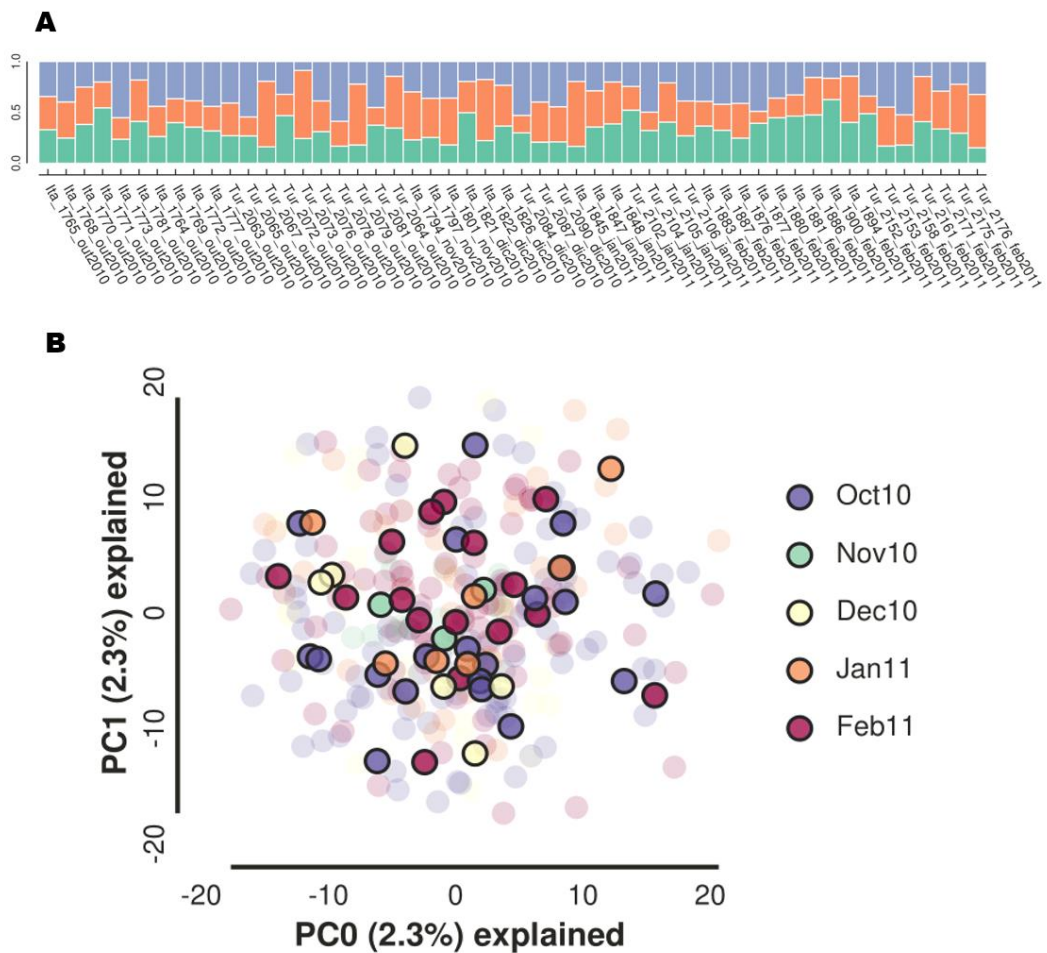
**Tabela 3** - Parâmetros de diversidade genética calculados para as 3 agrupações analisadas do dourado *S. brasiliensis* no alto e médio rio Uruguai (N = número de indivíduos, Ho = Heterozigidade observada, He = Heterozigidade esperada, Fis = Coeficiente de endogamia)

	N	Ho	He	Fis
Itã	28	0.2777	0.2855	0.04479
Rio Turvo	24	0.2725	0.2834	0.05881
Total	52	0.2751	0.2905	0.0528

### V.4 Identidade de SNPs sob seleção

O pipeline GeMoMa v1.9 anotou em total 24 775 genes. Na tabela 4 se apresentam a lista total de genes onde foram mapeados nossos supostos marcadores adaptativos. No conjunto total de indivíduos, foram mapeados 46 dos 121 supostos SNPs adaptativos e somente 15 ocorreram em regiões CDS. Para indivíduos de Itã, se mapearam 26 das 70 variantes e apenas uma ocorreu em uma região CDS. Finalmente, para indivíduos de Turvo, só foram mapeados 10 SNPs, e 4 deles ocorreram em regiões CDS.





**Figura 3** - Análises de estrutura genética usando supostos SNPs neutros (8963/15 990 SNPs). A: gráfico de barras no STRUCTURE (K= 3) e B: eixos um e dois resultantes da PCA. Indivíduos no gráfico de barras foram ordenados de acordo com o mês de amostragem. No PCA, a porcentagem da variação total explicada por cada eixo é mostrada.

### Proteína de ligação ao RNA YTH N6-metiladenosina F3

(Categoria COG: S – função desconhecida). Inferindo a partir da sequência ou similaridade estrutural, atua na regulação do processo do ciclo celular meiótico envolvido na maturação de ovócitos, na divisão celular de espermatogônias e na geração de gametas.

### Sorting nexin 20

(Categoria COG: DUZ – Controle do ciclo celular e mitose, Tráfego e secreção intracelular, Citoesqueleto). Componente celular na membrana do endossomo inicial. Inferido a partir de anotação eletrônica, tem como função molecular a ligação de fosfato de fosfatidilinositol e está envolvido no transporte de proteínas.

### Centrosoma ALMS1 e proteína associada ao corpo basal

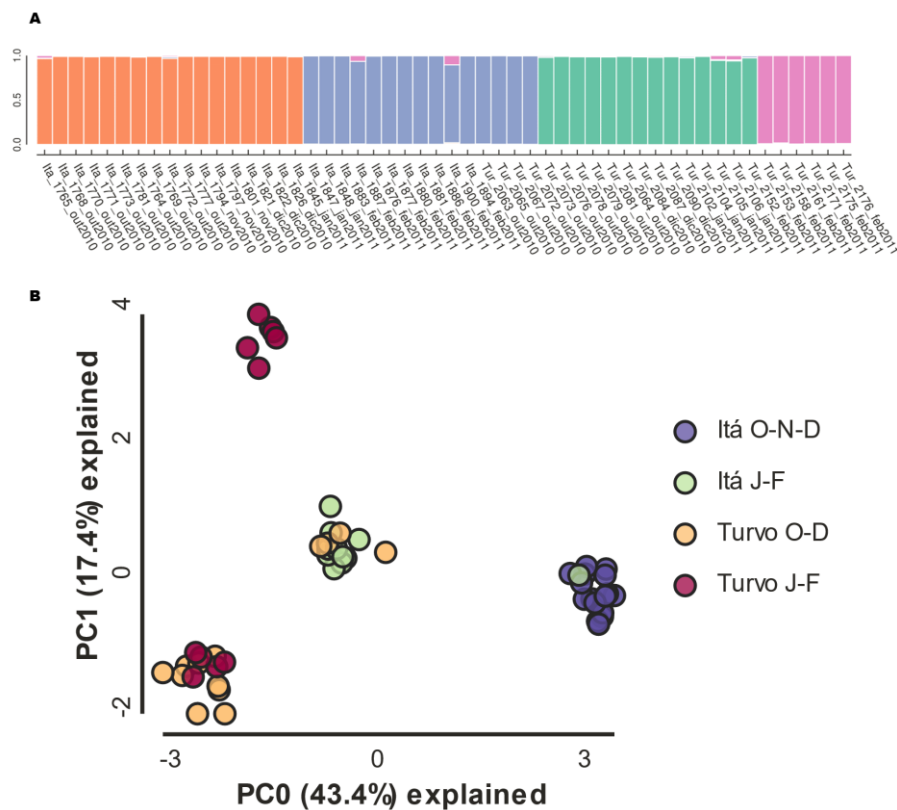
(Categoria COG: S – função desconhecida). No centríolo, centrosoma e no citosol da célula. Se sugere que atua na ligação de microtúbulos e em processos biológicos como o transporte de glucose e na regulação da replicação do centríolo.

### ST3 beta-galactosídeo alfa-2,3-sialiltransferase 7

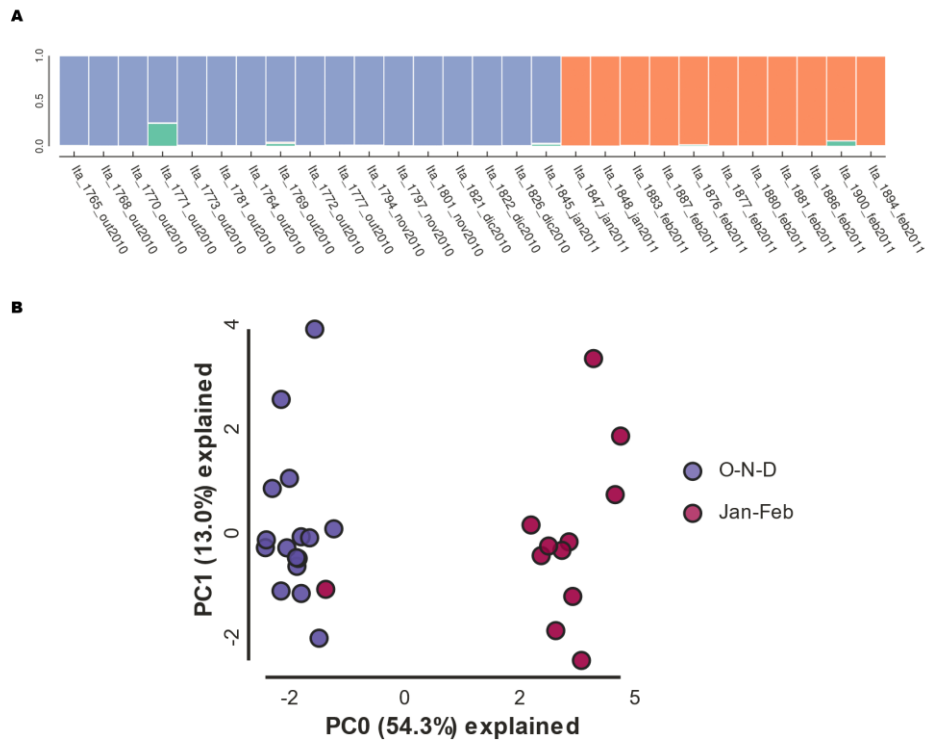
(Categoria COG: G - Metabolismo e transporte de carboidratos) No Aparato de Golgi e na membrana celular. Tem atividade exo-alfa-sialidase e lactosilceramida alfa-2,3-sialiltransferase. Envolvido em processos de glicosilação de proteínas.

### Proteína 1 interativa com helicase WRN

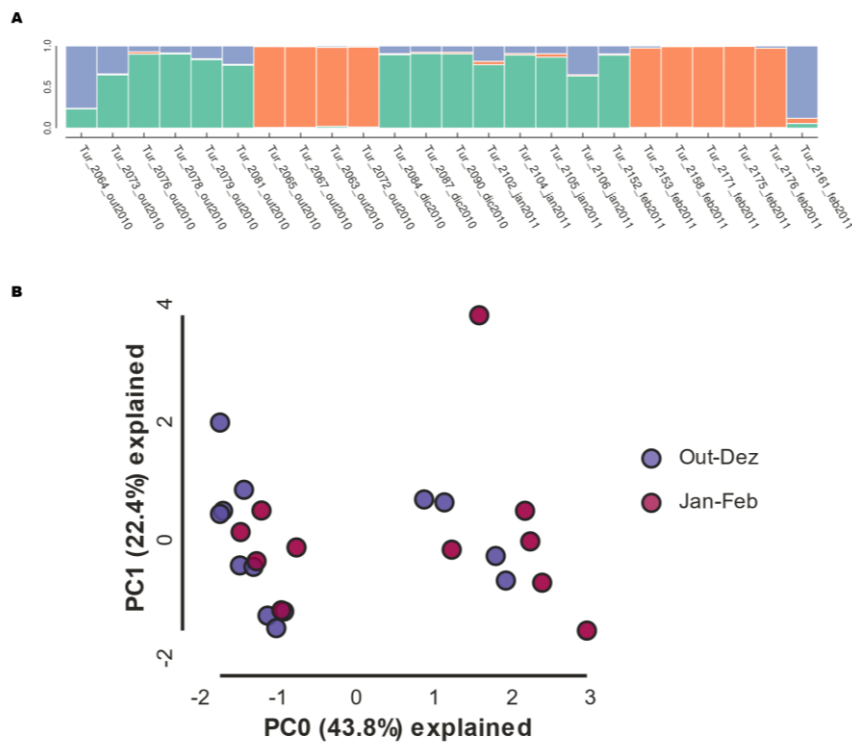
(Categoria COG: O - Modificação pós-traducional, renovação de proteínas, funções de chaperonas). No núcleo celular. Tem atividade de ligação e hidrólises de ATP e ligação de íons metálicos. Atua em processos de reparação e replicação do DNA.



**Figura 4** - Análises de estrutura genética usando supostos SNPs adaptativos (59/121 SNPs). A: gráfico de barras no STRUCTURE (K= 4) e B: eixos um e dois resultantes da PCA. Indivíduos no gráfico de barras foram ordenados de acordo com a localidade e o mês de amostragem.



**Figura 5** - Análises de estrutura genética usando o painel de supostos SNPs adaptativos (55/70 SNPs) para indivíduos de Itá. A: Gráfico de barras obtido em STRUCTURE para indivíduos do ponto de Itá. B: B: eixos um e dois resultantes da PCA.



**Figura 6** - Análises de estrutura genética usando o painel de supostos SNPs adaptativos (23/29 SNPs) para indivíduos de Turvo. A: Gráfico de barras obtido em STRUCTURE para indivíduos do ponto de Itá. B: B: eixos um e dois resultantes da PCA

**Tabela 4 - Genes onde ocorreram nossos supostos SNPs adaptativos (Em negrito: SNPs mapeados em regiões CDS)**

Dados	Gene	CÓDIGO
	Family with sequence similarity 184-member Ab	FAM184AB
	Gene rich cluster, C10 gene	GRCC10
	<b>PR/SET domain 14</b>	<b>PRDM14</b>
	Staufen double-stranded RNA binding protein 2	STAU2
	<b>YTH N6-methyladenosine RNA binding protein F3</b>	<b>YTHDF3</b>
	<b>Sorting nexin 20</b>	<b>SNX20</b>
	Caprin family member 2	CAPRIN2
	Desumoylating isopeptidase 1a	DESI1A
	<b>ALMS1 centrosome and basal body associated protein</b>	<b>ALMS1</b>
	<b>ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 7</b>	<b>ST3GAL7</b>
	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E, a	EIF3EA
	<b>Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 3</b>	<b>LOC103027744</b>
	Acyl-CoA binding domain containing 6	ACBD6
	MON1 secretory trafficking family member Ba	MON1BA
	AT-rich interaction domain 5A	ARID5A
	dkey-112m2.1	SI:DKEY-112M2.1
	LSM1 homolog, mRNA degradation associated	LSM1
	Low density lipoprotein receptor-related protein 1Bb	LRP1BB
	Extended synaptotagmin-like protein 2b	ESYT2B
	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 21	LOC103032654
<b>Total</b>	<b>WRN helicase interacting protein 1</b>	<b>WRNIP1</b>
	Eph-like kinase 1	EK1
	COPI coat complex subunit alpha	COPA
	<b>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2a</b>	<b>PAK2A</b>
	<b>Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1</b>	<b>SI:CH211-266G18.9</b>
	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	ITPR2
	Histone deacetylase 7a	HDAC7A
	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1	SGK1
	Rho guanine nucleotide exchange factor 6	LOC103031185
	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3, like	ARHGEF3L
	Catenin beta like 1	CTNNBL1
	<b>VPS51 subunit of GARP complex</b>	<b>VPS51</b>
	<b>PATJ crumbs cell polarity complex component</b>	<b>PATJ</b>
	Microtubule-associated protein 1Sa	MAP1SA
	<b>Polycystic kidney disease 1 like 2a</b>	<b>PKD1L2A</b>
	CHM Rab escort protein	CHM
	ATPase phospholipid transporting 11A	ATP11A
	<b>Peptidoglycan-binding, domain containing 3</b>	<b>LYSMD3</b>
	<b>Ubiquitin specific peptidase 39</b>	<b>USP39</b>
	<b>F-box and leucine rich repeat protein 15</b>	<b>FBXL15</b>
	Myocardin	MYOCD

	Leucine rich repeat containing 45	LRRC45	
	Tyrosine-protein kinase receptor UFO	LOC103027673	
	Neurexin-2	LOC103040758	
	Eyes shut homolog	EYS	
	Low density lipoprotein receptor-related protein 1Ab	LRP1AB	
	Carbohydrate-responsive element-binding protein	LOC103022906	
	Laminin subunit alpha 2	LAMA2	
	VPS41 subunit of HOPS complex	VPS41	
	TNFAIP3-interacting protein	LOC103028097	
	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3a	MARK3A	
	Retinoid x receptor, beta b	RXRBB	
	MON1 secretory trafficking family member Ba	MON1BA	
	si:dkey-92i17.2	SI:DKEY-112M2.1	
	Caspase recruitment domain family member 14	CARD14	
	Family with sequence similarity 49-member Ba	FAM49BA	
	Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1-like	LOC103025372	
	<b>Rab interacting lysosomal protein</b>	<b>RILP</b>	
	FAT atypical cadherin 3a	FAT3A	
Itá	Ras association domain family member 9	RASSF9	
	Rho guanine nucleotide exchange factor 6	LOC103031185	
	Cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2	CNIH2	
	si:zfos-588f8.1	SI:ZFOS-943E10.1	
	Muscle-specific beta 1 integrin binding protein	MIBP	
	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 1	HERC1	
	ALF transcription elongation factor 1	AFF1	
	Small vasohibin binding protein	LOC103047289	
	Hyaluronidase 2b	HYAL2B	
	DNAH1 - dynein axonemal heavy chain 1	DNAH1	
	TAF4A RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	TAF4A	
	Myocardin	MYOCD	
	si:ch73-382f3.1	SI:CH73-382F3.1	
		<b>Prostate transmembrane protein, androgen induced 1</b>	<b>PMEPA1</b>
		<b>tetratricopeptide repeat domain 22</b>	<b>TTC22</b>
		X-ray repair cross complementing 5	XRCC5
	latent transforming growth factor beta binding protein 1	LTBP1	
Turvo	family with sequence similarity 83-member Fa	FAM83FA	
	transmembrane protein 120B	TMEM120B	
	<b>Peptidoglycan-binding, domain containing 3</b>	<b>LYSMD3</b>	
	<b>zgc:85932</b>	<b>ZGC:85932</b>	
	protein tyrosine phosphatase receptor type Sb	PTPRSB	
	nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	

### **Cinase 2a ativada pela proteína p21 (Cdc42/Rac)**

(Categoria COG: T - Transdução de sinal). No citoplasma da célula, com atividade de ligação ao ATP e proteína serina/treonina quinase. Participa na transdução de sinal intracelular.

### **Canal 3 ativado por nucleotídeo cíclico ativado por hiperpolarização de potássio/sódio**

(Categoria COG: P - Transporte e metabolismo de íons inorgânicos). Tem atividade de ligação ao cAMP e atividade do canal de sódio. Participa em processos do transporte transmembrana de íons potássio, transporte transmembrana de íons sódio e regulação da despolarização da membrana.

### **Proteína 1 associada ao receptor do fator de crescimento transformador beta**

(Categoria COG: U – Tráfego e secreção intracelular). No espaço extracelular. Tem atividade de citocina e atividade do fator de crescimento. Atua na regulação positiva na divisão celular e na via de sinalização do receptor beta do fator de crescimento transformado (crescimento celular).

### **Subunidade VPS51 do complexo GARP**

(Categoria COG: U – Tráfego e secreção intracelular). Participa na organização e transporte de vesículas no aparato de Golgi. Transporte de Lipídios, proteínas e transporte lisossomal.

### **Componente complexo de polaridade celular de migalhas PATJ**

(Categoria COG: F - Metabolismo e transporte de nucleotídeos). InaD-like. Esta proteína localiza-se nas junções estreitas e na membrana apical das células epiteliais e participa no processo de montagem das junções estreitas.

### **Doença renal policística 1 like 2<sup>a</sup>**

(Categoria COG: PT - Transporte e metabolismo de íons inorgânicos, Transdução de sinal). Proteína componente da membrana celular. Tem atividade do canal de cálcio, ligação de íons de cálcio e participa em processos de detecção de estímulo mecânico.

**Domínio de ligação ao peptidoglicano contendo 3**

(Categoria COG: S – função desconhecida). Se encontra na membrana e o citoplasma celular. Inferido a partir da sequência ou similaridade estrutural se sugere que participa na organização do aparato de Golgi.

**Peptidase 39 específica de ubiquitina**

(Categoria COG: O - Modificação pós-traducional, renovação de proteínas, funções de chaperonas). Localizado no nucleoplasma. Previsto para habilitar a deubiquitinase dependente de tiol e a atividade de ligação de íons de zinco. Envolvido na montagem do complexo spliceosomal.

**Proteína 15 rica em leucina e F-box**

(Categoria COG: S – função desconhecida). Localizada no citoplasma e no complexo de ligase de ubiquitina SCF, que catalisa a ubiquitinação de proteínas destinadas à degradação proteasomal. Inferido da sequência ou semelhança estrutural é previsto de participar na ubiquitinação de proteínas.

**Proteína lisossomal interagindo com Rab**

(Categoria COG: S – função desconhecida). Participa nos processos de morfogênese de células epiteliais, transdução de sinal mediada por óxido nítrico e no transporte de proteínas da membrana ciliar para a membrana plasmática.

**Proteína transmembrana da próstata, induzida por andrógeno 1**

(Categoria COG: T – Transdução de sinal). Está envolvido na regulação negativa da via de sinalização do receptor beta do fator de crescimento transformador, que controla a proliferação e diferenciação celular.

**Domínio de repetição de tetratricopeptídeo 22**

(Categoria COG: S – função desconhecida). Não se tem informação

## VI. DISCUSSÃO

O dourado *Salminus brasiliensis* é uma espécie potamódroma de grande importância ecológica e econômica, dois fatores que sugerem sua classificação como potencial espécie emblemática (“*Flagship species*”) (Graciano *et al.*, 2022). Portanto, é necessária a recopilação de dados biológicos de diferentes fontes de informação que forneçam a conservação e gestão apropriada deste recurso para a garantia de sua viabilidade. Para este estudo, foram empregados métodos moleculares (genômica populacional - GBS) para a descrição do estado de conservação de indivíduos que ocorrem nas regiões alta e média da bacia do rio Uruguai, sendo o primeiro a área mais impactada pela ocupação humana (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003) e a segunda, uma das poucas áreas preservadas que garantam o sucesso reprodutivo não apenas do dourado, mas também de muitas espécies migratórias (Mounic-Silva *et al.*, 2019; Soares *et al.*, 2022).

### VI.1 Diversidade do dourado *Salminus brasiliensis*

O alto rio Uruguai, uma área impactada pela poluição das águas devido à criação de suínos e aves, além da pesca excessiva e alterações do habitat causadas pela construção das UHE Itã, Foz de Chapecó e Machadinho (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003), não apresentou reflexos claros desses efeitos em nossos parâmetros de diversidade genética ( $H_o$ ,  $H_e$ ,  $F_{is}$ ).

Embora os impactos ambientais no alto rio Uruguai sejam significativos e potencialmente prejudiciais às espécies migratórias, esses efeitos não parecem ter se refletido nos parâmetros de diversidade genética avaliados em nosso estudo. Essa aparente resiliência contrasta com os resultados observados em populações de *Salmo trutta* em rios fortemente impactados da Finlândia, onde Lemopoulos *et al.* (2019) relataram uma redução populacional acentuada e baixos níveis de heterozigosidade devido a múltiplos fatores antropogênicos.

Em contraste, os valores de  $H_o$  para dourados das áreas estudadas (ver Tabela 3) são altos em comparação com peixes marinhos (Sherman *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023) e de água doce (Torati *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2022), além de concordarem com os altos valores calculados por Ribolli *et al.* (2017) usando microssatélites.

## VI.2 Evidência de subestrutura populacional

Nossos supostos SNPs neutros sugeriram que *S. brasiliensis* da área estudada compõem uma única população genética (ver Figura 3), enquanto SNPs adaptativos putativos indicaram certos níveis de estruturação populacional (ver Figura 4). Resultados similares foram descritos para o atum branco *Thunnus alalunga* do Norte e Sul do Oceano Pacífico usando um painel de 84 supostos SNPs adaptativos, mesmo quando marcadores neutros não mostraram diferenças significativas entre os atuns das duas áreas (Vaux *et al.*, 2021). Também, a aplicação de marcadores adaptativos foram capazes de diferenciar ecótipos em *Oncorhynchus nerka* (Rusello *et al.*, 2012); morfotipos em *Salvelinus alpinus* (O'Malley *et al.*, 2018) e na diferenciação de ondas reprodutivas migratórias temporalmente divergentes em peixes marinhos (Bekkevold *et al.*, 2016) e anádromos (O'Malley *et al.*, 2007; O'Malley *et al.*, 2013).

Por definição, a escolha de marcadores neutros é ideal para inferir sobre processos demográficos, como a migração, o isolamento (Antonίου *et al.*, 2017; O'Malley *et al.*, 2018) ou o fluxo gênico entre populações (Henry & Day, 2005, Hoelzel, 2023). A falta de evidência de estruturação populacional usando nossos supostos SNPs neutros sugere que os Dourados que habitam o alto e médio rio Uruguai constituem uma população panmictica, com indivíduos capazes de circular pelas cachoeiras do Yucumã e mantendo conectividade genética durante a estação reprodutiva. Esse resultado é apoiado pelos estudos de telemetria conduzidos por Hann *et al.* (2011) e a ausência de estruturação populacional genética espacial descrita por Ribolli *et al.* (2017) e Ribolli *et al.* (2021), entre Dourados das áreas estudadas.

Em contraste, supostos SNPs adaptativos revelaram a existência de quatro grupos genéticos, explicados tanto espacialmente enquanto temporalmente. Este padrão de dois tempos de desova em *S. brasiliensis* é consistente com estudos prévios usando a média da relação gonadosomática (RGS) em dourados do alto rio Uruguai, onde podem se ver dois picos da RGS (ver Figura S2): o primeiro de outubro a dezembro e o segundo de janeiro a fevereiro (ver Machado 2003 e Zaniboni-Filho *et al.*, 2017). Desse modo, esses marcadores revelaram duas ondas reprodutivas temporalmente divergentes nas duas regiões do rio Uruguai, recuperando

parcialmente os resultados de Ribolli *et al.* (2017) usando microssatélites. Além disso, também sugerem uma estruturação espacial.

Encontramos na literatura dois possíveis explicações para esse componente espacial. Primeiro, a existência do comportamento de *homing* em *S. brasiliensis* deste sistema hidrográfico. Em um estúdio prévio de telemetria, o retorno de dois indivíduos liberados no Parque do Turvo para Ita em duas ocasiões sugeriu fidelidade aos locais de desova que historicamente estavam localizados rio acima da barragem (Hann *et al.*, 2011). Em segundo lugar, diferenças na relação comprimento- peso de dourados do alto e médio Uruguai realizados por De Oliveira & Zaniboni-Filho (2009) e Massaro *et al.* (2019), respectivamente. Diferenças no tipo de crescimento (ver Froese, 2006) entre os dourados das duas regiões podem impactar as taxas de crescimento e outras características intrínsecas, as quais também podem influenciar a estrutura genética da espécie (Papadopoulou & Knowles, 2016). Tais variações morfológicas podem estar diretamente associadas a processos genéticos, especialmente quando estão submetidos à seleção natural (McBride, 2013).

Interpretar o componente temporal, por outro lado, é mais desafiador devido à escassez de dados hidrológicos específicos do período correspondente ao nosso estudo (2010–2011). No entanto, sabe-se que a heterogeneidade ambiental pode causar seleção disruptiva (Yeaman & Whitlock, 2011). Se isso também acontece ao longo da estação reprodutiva, então pode levar à segregação temporal. Assim, nossos resultados indicaram que a seleção estaria atuando tanto temporal quanto espacialmente, promovendo a estruturação populacional observada.

A estruturação genética populacional espacial e temporal já foi relatada em diferentes espécies de peixes (Coulson *et al.*, 2006; Ludwig *et al.*, 2023) e parece ser um fenômeno convergente recorrente ao longo da filogenia dos peixes. Curiosamente, em vários estudos, poucos indivíduos supostamente de uma população são geneticamente atribuídos a outras populações, como já foi relatado na migração reprodutiva do salmão (Moore *et al.*, 2014) e em grandes peixes pelágicos altamente migratórios (Mamoozadeh *et al.*, 2020).

Algo semelhante pode estar ocorrendo entre *S. brasiliensis* do alto e médio rio Uruguai. Embora a maioria dos indivíduos atribuídos ao grupo Early-Itá fossem coletados de outubro a dezembro, um indivíduo foi coletado em janeiro (ver Figura 5).

Esse padrão de descompasso aparente se repete nos outros grupos obtidos nas análises de estruturação usando os supostos SNPs adaptativos. No grupo Early-Turvo, cinco indivíduos atribuídos a esse grupo foram coletados em janeiro.

Essas descobertas podem indicar uma certa plasticidade que pode permitir que alguns indivíduos de desova precoce migrem e provavelmente se reproduzam tardiamente; constituindo migrantes entre as populações. Se assim for, também se poderia esperar encontrar indivíduos do grupo genético de desova tardia sendo coletados no tempo mais precoce (coisa que aconteceu em nosso estudo). Assim, quatro indivíduos coletados na região de Turvo durante outubro foram atribuídos ao grupo Itá tardio. É sugerido que esses quatro espécimes coletados no início de Turvo eram migrantes para o Itá a montante (ver Fig. 1), onde provavelmente desovariam durante o tempo tardio, já que a migração longa a montante de *S. brasiliensis* já foi relatada no alto rio Uruguai (Hann *et al.*, 2011).

### **VI.3 Identidade dos supostos SNPs adaptativos**

Entre os 78 SNPs adaptativos putativos mapeados para o genoma de referência, a maioria foi encontrada em íntrons, o que pode afetar as taxas de transcrição se essas regiões não codificantes representarem locais regulatórios das proteínas correspondentes (Liao & Lee, 2010). Para nossa surpresa, não todos aqueles outliers identificados em cada ponto de coleta estiveram contidos dentro do conjunto de outliers do total de indivíduos. Apenas 3 SNPs foram considerados como adaptativos tanto no Itá quanto no total de indivíduos, e entre Turvo e o total de indivíduos, apenas 1 SNP. Esse cenário provavelmente foi produto das filtrações realizadas no PLINK, dado ao diferente número de dourados em cada conjunto de dados, resultando em SNPs diferentes para cada um deles. Além disso, os efeitos da estrutura populacional e a variação genética dentro e entre os pontos de coleta podem contribuir para a aparição de diferentes conjuntos de outliers, dado que drivers de divergência não são necessariamente uniformes através de todos os loci e populações (Bierne *et al.*, 2011).

Por sua vez, entre os 20 SNPs CDS obtidos, a maioria foi observada em genes envolvidos em processos celulares gerais, mas a mutação sinônima G744A (Figura S3) foi mapeada no gene da proteína de ligação ao RNA YTH N6-metiladenosina F3 (YTHDF3) a qual, junto a YTHDF1 e YTHDF2, desempenha papéis críticos para acelerar o metabolismo de mRNAs modificados por m6A no citoplasma

(Jiang *et al.* 2021). Especificamente, a expressão de YTHDF3 poderia atuar como um “agente de buffer” para acesso alvo a YTHDF1 e YTHDF2 (Shi *et al.* 2017).

Embora mutações sinônimas não levem a nenhuma alteração de aminoácido no nível da proteína devido à redundância do código genético, SNPs sinônimos também podem produzir fenótipos diferentes alterando o dobramento do mRNA e aumentando a estabilidade, permitindo maior nível de produção de proteínas. (ver Liao & Lee, 2010). Além disso, com base na similaridade estrutural, o banco de dados UniProt sugere seu envolvimento em processos que regulam a maturação do oócitos e a divisão celular de espermatogônias (geração de gametas). Já foi relatado que a deficiência de YTHDF2 e YTHDF3 interrompe o desenvolvimento das gônadas femininas no peixe-zebra *Danio rerio* (Kontur *et al.*, 2020) e a análise de expressão da metilação do RNA m6A sugere um papel potencial da epitranscriptômica na maturação sexual do Salmão do Atlântico *Salmo salar* (Ahi *et al.*, 2024).

Com essas informações, sugerimos a participação de YTHDF3 no desenvolvimento das gônadas de *S. brasiliensis* durante a temporada de desova, com diferentes padrões de alelos deste loco representando assinaturas genéticas que definiriam as ondas de desova early e late. Como os genes restantes estão ou não envolvidos com este padrão de desova temporal é ainda uma pergunta a ser respondida.

De fato, ainda quando as funções biológicas do resto de genes estão restritas ao nível celular, há possibilidade de elas estarem relacionadas ao padrão de estruturação temporal sugerido por nossos marcadores adaptativos. Com base no dogma central, os SNPs podem afetar fenótipos nos níveis de DNA, RNA e proteína (ver Liao *et al.*, 2010), que são chamados "fenótipos internos", envolvidos em propriedades celulares, de nível tecidual e fisiológicas. Esses fenótipos internos, por sua vez, moldam fenótipos externos, como a morfologia e o comportamento (Houle *et al.* 2010). Dada a complexidade da relação genótipo - fenótipo, essas mudanças genéticas iniciais podem desencadear uma cadeia de efeitos que influenciam tanto as funções internas do organismo quanto suas características observáveis.

Lembrando que, o GBS pode não detectar todas as regiões sob seleção devido à cobertura desigual do genoma causada pelos cortes de enzima de restrição específicas, isso pode significar que os genes detectados podem estar em

desequilíbrio de ligação com os verdadeiros loci adaptativos, que aumentam em frequência junto com eles devido à proximidade cromossômica. Além disso, a significância adaptativa de supostos loci adaptativos é frequentemente evasiva porque eles podem não ser o alvo direto da seleção, mas sim exibir “carona” com genes sob seleção (Smith & Haigh, 1974). Para *Clupea harengus*, Limborg *et al.* (2012) e Bekkevold *et al.* (2016) sugerem a existência de “carona genética” para mudanças de frequência de alelos em loci adaptativos na diferenciação de ecótipos “spring” e “autumn” no Atlântico Nordeste, quando SNPs que ocorreram em genes não relacionados com o tempo de reprodução foram sugeridos como outliers.

Feder *et al.* (2012) apontam que durante os estágios iniciais da divergência ecológica, quando o fluxo gênico ainda está em andamento, uma ‘divergência de carona’ pode resultar em diferenciação genética localizada, conhecida como “ilhas genômicas” que promovem o agrupamento de genes envolvidos na adaptação (Yeaman & Whitlock 2011). Além disso, Mallet (2008) destaca que entre os ecótipos, a divergência limitada a regiões genômicas específicas deve, de fato, ser mais facilmente observável no início do processo de divergência.

Para peixes, a presença de ilhas genômicas foi proposta por Hemmer-Hansen *et al.* (2013) na diferenciação de ecótipos ‘residentes’ e ‘migrantes’ em *Gadus morhua* e, para *Clupea harengus*, Bekkevold *et al.* (2016) levantaram a hipótese de que o arenque que desova no Outono pode abrigar uma ou mais ilhas genômicas ligadas à divergência de ecótipos. Essa observação, juntamente com o alto fluxo gênico sugerido pelo baixo índice de diferenciação, sugere um cenário semelhante aos descritos para *Gadus morhua* e *Clupea harengus*, com essas ondas reprodutivas possivelmente representando dois ecótipos potenciais de dourado *S. brasiliensis* do alto e médio rio Uruguai: “Early” e “Late”, em estágios iniciais de divergência.

#### **VI.4 IBT ou ABT em *Salminus brasiliensis*?**

Embora qualquer loco pode refletir o IBT, Henry & Day (2005) sugerem a concentração em supostos loci neutros, porque estes são mais úteis para inferir o fluxo gênico e, em definição, se consideram ideais também para inferir processos demográficos como a migração e o isolamento (Antonioni *et al.*, 2017; O’Malley *et al.*, 2018, Hoelzel, 2023). Nesse contexto, como nosso painel de 15 990 supostos SNPs neutros não mostrou uma estrutura genética temporal, o IBT descrito por Henry & Day (2005) não parece estar ainda presente nos dourados do alto e médio rio Uruguai. Na

teoria do IBT, os autores indicaram que o tempo de reprodução está sob controle genético e recopilaram evidências de que, em peixes salmonídeos, este tem um forte componente hereditário. No caso do dourado, não se encontraram estudos que garantem que caracteres como a maturação final, início da subida ou a chegada aos locais de desova estejam sob controle genético.

Em contraste, o período estendido de desova descrito por Zaniboni-Filho *et al.* (2017) sugere uma plasticidade reprodutiva, como acontece em outros peixes neotropicais (Brandão *et al.*, 2017). O tempo de reprodução é considerada uma característica quantitativa lábil que varia ao longo do ciclo de vida em decorrência de respostas plásticas ao médio ambiente, devido a respostas fisiológicas e comportamentais do organismo (Gomulkiewicz & Kirkpatrick, 1992; Childs *et al.*, 2016). Portanto, essa plasticidade reprodutiva poderia se considerar como uma exemplo plasticidade fenotípica, a qual é evidente em praticamente todas as características quantitativas (Roff, 1997).

Essa plasticidade fenotípica poderia explicar nossos ótimos valores de diversidade genética e porque estes não refletiram a pressão ambiental que acontece no alto rio Uruguai (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003), dado que segundo Mann *et al.* (1984), em ambientes heterogêneos ou relativamente instáveis, as espécies mais exitosas são aquelas selecionadas pela sua plasticidade fenotípica, especialmente se eles tiverem uma longa vida reprodutiva. Finalmente, dado que o autor sugere que a plasticidade fenotípica pode resultar na alteração das frequências génicas, a variação genética supostamente adaptativa detectada poderia ser o resultado da grande variedade de expressão fenotípica no genoma do dourado a se reproduzir em diferentes momentos (ver Zaniboni-Filho *et al.*, 2017), coisa que garanta o sucesso reprodutivo sob condições flutuantes, como acontece no alto rio Uruguai.

Ribolli (2014) trabalhou dois períodos reprodutivos consecutivos: 2010-2011 e 2011-2012, mas o padrão de IBT em *S. brasiliensis* só foi observado para o primeiro. Em conjunto com esta observação, Henry & Day (2005) indicam que, no caso de existir IBT, as diferenças genéticas devem ser estáveis ao longo das gerações, de modo que as amostras de vários períodos reprodutivos em vários anos se agrupem geneticamente por tempo e não por ano. Assim, quando Ribolli (2014) analisou em conjunto os dois períodos consecutivos, os indivíduos foram agrupados

segundo o ano de amostragem correspondente, resultado que não apoia a existência de IBT em *S. brasiliensis*.

Depois de esclarecer esses comentários do estudo original de Henry & Day (2005), não foi possível afirmar a existência do IBT nos dourados do alto e médio rio Uruguai. Mas ... e o mecanismo da ABT? A adaptação por tempo descrita pelos autores deve satisfazer os seguintes critérios: (i) a existência do IBT, (ii) uma característica fenotípica deve variar ao longo da estação reprodutiva e (iii) ter uma base genética. Para o primeiro critério, de acordo com nossos supostos SNPs neutros, o fluxo gênico ainda não é restringido temporalmente durante a estação reprodutiva. Enquanto para o segundo e o terceiro critério, neste estudo não foram analisados caracteres que representem uma variação fenotípica na temporada reprodutiva e puderam ser associados com nossos supostos SNPs adaptativos.

Dessa maneira, nossas análises também não sugerem a presença da ABT para os dourados do alto e médio rio Uruguai. No entanto, como foi discutido acima, a seleção em presença de um alto fluxo gênico seria o principal responsável pela estrutura genética observada, dado que só foi detectada usando marcadores adaptativos. Mesmo que não haja IBT prévio, as diferenças resultantes nas adaptações podem promover a divergência evolutiva entre as populações as quais, eventualmente, poderiam ser diferenciadas usando dados neutros. Assim, o processo onde adaptações temporais conduzem ao isolamento temporal pode ser referido como uma “Seleção divergente temporal”, o qual seria o mecanismo responsável da presença de dois potenciais ecotipos de dourado *S. brasiliensis* no alto e médio rio Uruguai.

### **VI.5 Considerações finais**

Apesar das interessantes descobertas, existem algumas questões que podem comprometer nossos resultados. Primeiro, estamos assumindo que as áreas trabalhadas correspondem locais de desova. Para nossa área de estudo, somente o ponto de Turvo está próxima a uma potencial área de desova descrita por Mounic-Silva *et al.* (2019) no médio Uruguai: a jusante do Salto de Yucumã. Em contrapartida, para o alto rio Uruguai, Hann *et al.*, (2011) comentaram a grande falta de habitats adequados para a desova tanto no rio principal como nos tributários a jusante da UHE Ita (nosso ponto de amostragem).

Assumindo como locais de desova nossos pontos de amostragem, surge a segunda questão, onde também se assume que nossos indivíduos são reprodutores (maduros, ou já esvaziados). Como nosso estudo está baseado na amostragem conduzida por Ribolli *et al.* (2017), não temos informação de caracteres reprodutivos que possam ser associados à variação genética supostamente adaptativa detectada e corroborem o cenário de primeiros reprodutores e reprodutores tardios sugerido para nosso estudo. Além disso, é importante lembrar que esses potenciais ecótipos estão baseados em um estudo conduzido entre 1998 - 2002 e, embora no estudo atualizado (1996 – 2014) de Zaniboni-filho *et al.* (2017), ainda podem-se apreciar os dois picos de desova, o mais adequado seria conduzir um estudo integrativo que incluía informações morfológicas e genéticas.

Em suma, mesmo quando marcadores neutros falham em revelar padrões de estruturação genética populacional, a identificação de SNPs adaptativos putativos pode ser particularmente eficaz para distinguir a estruturação populacional em sistemas com alto nível de fluxo gênico (Anderson *et al.*, 2019; Vaux *et al.*, 2021; Vaux *et al.*, 2023). Dessa forma, as ondas de desova em *S. brasiliensis* do alto e médio rio Uruguai possivelmente representam dois ecótipos potenciais que, para a perspectiva de conservação, devem ser considerados como estoques recentemente divergentes que requerem manejo pesqueiro específico. No entanto, Moore *et al.* (2014) consideram que, ao definir unidades de conservação, é improvável que marcadores adaptativos putativos identificados a partir de estudos genômicos forneçam uma alternativa prática ao uso de dados ecológicos ou fenotípicos. A partir desse comentário, fica evidente que estudos que incluam variação fenotípica e dados ecológicos são necessários para ajudar a identificar unidades de manejo que garantam o status de conservação de *S. brasiliensis* no rio Uruguai.

## VII. CONCLUSÕES

- Foram identificados 121 supostos SNPs adaptativos em 56 indivíduos de dourado *S. brasiliensis* do alto e médio rio Uruguai, os quais explicaram um padrão temporal de desova composto por 4 grupos genéticos (2 de Itá e 2 de Turvo).
- A partir das análises do total de SNPs e supostos SNPs neutros, sugere-se que os dourados amostrados a jusante da UHE Itá e na Foz do rio Turvo constituem uma única população panmictica, com altos valores de diversidade genética e que o Salto de Yucumã não representa uma barreira efetiva ao fluxo gênico, permitindo a conectividade entre as áreas mencionadas durante a estação reprodutiva.
- Os 11 marcadores SSR e nossos 121 supostos SNPs adaptativos concordaram em revelar um padrão de estruturação genética temporal. No entanto, os primeiros sugerem a existência de três ondas temporalmente reprodutivas enquanto nossos resultados sugerem a existência de dois potenciais ecótipos de *S. brasiliensis*: Early e Late.
- Devido à natureza de nossos marcadores, não foi possível confirmar a existência do Isolamento por tempo (Henry & Day, 2005) proposta por Ribolli *et al.* (2017). Por outro lado, postula-se a existência de dois ecótipos de *S. brasiliensis* resultado de uma “Seleção divergente temporal”.
- Foi mapeado um SNP num gene que estaria relacionado no desenvolvimento de gônadas (YTHDF3) em peixes, o qual poderia representar uma assinatura da estrutura genética temporal observada em nosso estudo. Por outro lado, sugere-se que o resto de SNPs exibiram “carona genética” com regiões do genoma que estão verdadeiramente sob seleção e provavelmente contidas em “ilhas genômicas”, como evidência de uma recente divergência ecológica.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABILHOA, V.; DUBOC, L. F. Peixes. In: MIKICH, S.B.; R.S. BÉRNILS, (Eds.). Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná. **Instituto Ambiental do Paraná**, p. 581-677, 2004.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; FERNANDEZ, D. R.; SUZUKI, H. I. Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. **River Research and Applications**, v. 18, n. 3, p. 299–306, 2002.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; VERÍSSIMO, S.; OKADA, E. K. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: Effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 14, n. 1, p. 11–19, 2004.
- AHI, E. P.; FRAPIN, M.; HUKKANEN, M.; PRIMMER, C. R. Hypothalamic expression analysis of m6A RNA methylation associated genes suggests a potential role of epitranscriptomics in sexual maturation of Atlantic salmon. **Aquaculture**, v. 579, n. September 2023, p. 740151, 2024.
- ANDERSON, G. A.; HAMPTON, J.; SMITH, N.; RICO, C. Indication of strong adaptive population structure in albacore tuna (*Thunnus alalunga*) in the southwest and central Pacific Ocean. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 18, p. 10354– 10364, 2019.
- ANTONIOU, A.; KASAPIDIS, P.; KOTOULAS, G.; MYLONAS, C. C.; MAGOULAS, A. Genetic diversity of Atlantic Bluefin tuna in the Mediterranean Sea: Insights from genome-wide SNPs and microsatellites. **Journal of Biological Research (Greece)**, v. 24, n. 1, p. 1–14, 2017. BioMed Central.
- BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A. Growth and first sexual maturation size of *Salminus maxillosus Valenciennes, 1849* (Characiformes, Characidae), in Mogi Guaçu river, state of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 453–459, 2001.
- BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A. Reproductive and nutritional dynamics of *Salminus maxillosus Valenciennes, 1849* (Pisces, Characidae) at Mogi Guaçu river, state of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 441–444, 2001.
- BARZOTTO, E.; MATEUS, L. Reproductive biology of the migratory freshwater fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) in the Cuiabá River basin, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 33, n. 3, p. 415–422, 2017.
- BEKKEVOLD, D.; GROSS, R.; ARULA, T.; HELYAR, S. J.; OJAVEER, H. Outlier loci detect intraspecific biodiversity amongst spring and autumn spawning herring across local scales. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 2016. Public Library of Science.
- BONETTO, A.A.; PIGNALBERI, C.; YUAN, E.C.; OLIVEROS, O. Informaciones complementarias sobre migraciones de peces em la cuenca del Plata. **Physis**, v. 30, n. 81, p. 505- 520, 1971.
- BRAGA-SILVA, A.; GALETTI, P. M. Evidence of isolation by time in freshwater migratory fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Hydrobiologia**, v. 765, n. 1, p. 159–167, 2016. Springer International Publishing.

- BRANDAÕ, L.E.D.; NASCIMENTO, A.V.; MARCON, L.; SANTOS, J.E.; SANTIAGO, K.B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Comparative analyses of reproductive activity in *Schizodon knerii* (Steindachner, 1875) (Characiformes: Anostomidae) in three sections of the São Francisco River basin. **J. Appl. Ichthyol**, v. 33, p. 1118–1124, 2017.
- BYE, V. J. The Role of Environmental Factors in the Timing of Reproductive Cycles. In: G. W. POTTS; R. J. WOOTTON (Orgs.); Fish reproduction. Strategies and Tactics. p.187–205, 1984. London.
- CARVALHO, G. R.; HAUSER, L. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. In *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 4, n. 3, p. 326–350, 1994.
- 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, n. 1 SUPPL. 1, p. 377–380, 2008.
- CASTRO, J. Río Uruguay. Una síntesis arqueológica. *Revista del Museo de La Plata*, v. 4, n. 2, p. 541–584, 2019.
- CATALDO, D.; GATTÁS, F.; LEITES, V.; BORDET, F.; PAOLUCCI, E. Impact of a hydroelectric power plant on migratory fishes in the Uruguay River. *River Research and Applications*, v. 36, n. 8, p. 1598–1611, 2020.
- CHILDS, D. Z.; SHELDON, B. C.; REES, M. The evolution of labile traits in sex- and age-structured populations. *Journal of Animal Ecology*, v. 85, n. 2, p. 329–342, 2016.
- COATES, B. S.; SUMERFORD, D. V.; MILLER, N. J.; et al. Comparative performance of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for population genetic analysis. **Journal of Heredity**, v. 100, n. 5, p. 556–564, 2009.
- CORRÊA, R. N. **Distribuição E Abundância De Ovos E Larvas De Peixes Em Três Tributários do Alto rio Uruguai**. 2008. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- COULSON, M. W.; BRADBURY, I. R.; BENTZEN, P. Temporal genetic differentiation: Continuous v. discontinuous spawning runs in anadromous rainbow smelt *Osmerus mordax* (Mitchill). **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. SUPPL. C, p. 209–216, 2006.
- DA ROSA, I. F.; DEOLIVEIRA, D.; DACRUZ, V.; et al. Temporal genetic structure of a stock of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) in the Mogi-Guaçu River ecosystem, São Paulo, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, n. 2, p. 1–18, 2022.
- DAVEY, J. W.; HOHENLOHE, P. A.; ETTER, P. D.; et al. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics**, 2011. Nature Publishing Group.
- DE CARVALHO, L. A. **Diversidade genética em Dourado (*Salminus brasiliensis* Curvier,1816), uma espécie de grande interesse comercial no Pantanal Mato-grossense**. 2010. Dissertação (Doutorado em Ecologia em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- DE OLIVEIRA NUÑER, A. P.; ZANIBONI-FILHO, E. Length-weight relationships of fish species caught in the Upper Uruguay River, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, n. 3, p. 362–364, 2009.

- DI PERSIA, D. H.; NEIFF, J. J.; OLAZARRI, J. The Uruguay River system. , p. 599–629, 1986.
- EATON, D. A. R.; OVERCAST, I. Ipyrad: Interactive assembly and analysis of RADseq datasets. **Bioinformatics**, v. 36, n. 8, p. 2592–2594, 2020.
- EDWARDS, D.; FORSTER, J. W.; CHAGNÉ, D.; BATLEY, J. What Are SNPs? Association Mapping in Plants. p.41–52, 2007.
- EIZAGUIRRE, C.; BALTAZAR-SOARES, M. Evolutionary conservation-evaluating the adaptive potential of species. **Evolutionary Applications**, v. 7, n. 9, p. 963–967, 2014.
- ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; et al. A Robust , Simple Genotyping-by-Sequencing ( GBS ) Approach for High Diversity Species. , v. 6, n. 5, p. 1–10, 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.
- FEDER, J.; EGAN, S.; NOSIL, P. The genomics of speciation-with-gene-flow. **Trends in Genetics**, v. 28, p. 342–350, 2012.
- FROESE, R. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. **J. Appl. Ichthyol**, v. 22, p. 241–253, 2006.
- FUNK, W. C.; MCKAY, J. K.; HOHENLOHE, P. A.; ALLENDORF, F. W. Harnessing genomics for delineating conservation units. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 9, p. 489 – 496, 2012.
- GARROD, D. J.; HORWOOD, J. W. Reproductive Strategies and the Response to Exploitation. In: G. W. POTTS; R. J. WOOTTON (Orgs.); Fish reproduction. Strategies and Tactics. p. 367–384, 1984. London: Academic Press.
- GODOY, M. P. Peixes do Brasil, subordem Characoidei: bacia do rio Mogí Guassú. Editora Franciscana, 1975.
- GOIS, K. S.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C.; AGOSTINHO, A. A. Invasion of an Amazonian cichlid in the Upper Paraná River: facilitation by dams and decline of a phylogenetically related species. **Hydrobiologia**, v. 746, n. 1, p. 401–413, 2015.
- GOMULKIEWICZ, R; KIRKPATRICK, M. Quantitative genetics and the evolution of reaction norms. **Evolution**, v. 46, p. 390 - 411, 1992.
- HAHN, L.; AGOSTINHO, A. A.; ENGLISH, K. K.; et al. Use of radiotelemetry to track threatened dorados *Salminus brasiliensis* in the upper Uruguay River, Brazil. **Endangered Species Research**, v. 15, n. 2, p. 103–114, 2011.
- HAMOY, I.; ARARIPE, J.; GUERREIRO, S.; SANTOS, S. GENÉTICA MOLECULAR APLICADA À CONSERVAÇÃO DE PEIXES AMAZÔNICOS. In: R. A. LOBÃO DE SOUZA (Org.); ECOSISTEMAS AQUÁTICOS: Tópicos Especiais. p.275–293, 2018. Belém.
- HATANAKA, T.; GALETTI, 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, 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.
- HEMMER-HANSEN, J.; NIELSEN, E. E.; THERKILDSEN, N. O.; et al. A genomic island linked to ecotype divergence in Atlantic cod. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 10, p. 2653–2667, 2013.
- HENDRY, A. P.; DAY, T. Population structure attributable to reproductive time: Isolation by time and adaptation by time. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 4, p. 901–916, 2005.
- HERMES-SILVA, S.; REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E. Spatial and temporal distribution of ichthyoplankton in the Upper Uruguay river, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 933–944, 2009.
- HILSDORF, A. W. S.; MARQUES, D. K. S.; RESENDE, E. K. DE. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Documentos 82, p. 45, 2006.
- HOELZEL, A. R. Where to now with the evolutionarily significant unit? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 28, n. 12, p. 1134–1142, 2023. Elsevier Ltd.
- HOULE, D.; GOVINDARAJU, D. R.; OMHOLT, S. Phenomics: The next challenge. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 12, p. 855–866, 2010. Nature Publishing Group.
- IRIONDO, M. H.; KRÖHLING, D. M.; MENÉNDEZ, G.; SCHREIDER, M. Cambios ambientales en la cuenca del río Uruguay. 2022.
- JIANG, X.; LIU, B.; NIE, Z.; et al. The role of m6A modification in the biological functions and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 2021.
- JUANES, F.; PEREZ, J.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Reproductive strategies in small populations: Using Atlantic salmon as a case study. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 16, n. 4, p. 468–475, 2007.
- KEILWAGEN, J.; HARTUNG, F.; GRAU, J. GeMoMa: Homology-Based Gene Prediction Utilizing Intron Position Conservation and RNA-seq Data. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 1962, p. 161–177. 2019
- KONG, L.; BAI, J.; LI, Q. Comparative assessment of genomic SSR, EST-SSR and EST-SNP markers for evaluation of the genetic diversity of wild and cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. **Aquaculture**, v. 420–421, 2014.
- KONTUR, C.; JEONG, M.; CIFUENTES, D.; GIRALDEZ, A. J. Ythdf m6A Readers Function Redundantly during Zebrafish Development. **Cell Reports**, v. 33, n. 13, p. 108598, 2020.
- LANDEGREN, U.; NILSSON, M.; KWOK, P. Y. Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. **Genome Research**, v. 8, n. 8, p. 769–776, 1998.
- LEMOPOULOS, A.; PROKKOLA, J. M.; UUSI-HEIKKILÄ, S.; et al. Comparing RADseq and microsatellites for estimating genetic diversity and relatedness — Implications for brown trout conservation. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 2106–2120, 2019.

- LI, Y. H.; WANG, H. P. Advances of genotyping-by-sequencing in fisheries and aquaculture. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, n. 3, p. 535–559, 2017. Springer International Publishing.
- LIAO, P.; LEE, K. H. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, n. 2, p. 149–158, 2010. Elsevier B.V.
- LIMBORG, M. T.; HELYAR, S. J.; DE BRUYN, M.; et al. Environmental selection on transcriptome-derived SNPs in a high gene flow marine fish, the Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Molecular Ecology*, v. 21, n. 15, p. 3686–3703, 2012.
- LIU, C.; SHRINGARPURE, S.; LANGE, K.; NOVEMBRE, J. Exploring Population Structure with Admixture Models and Principal Component Analysis. In: DUTHEIL, J.Y. (eds) *Statistical Population Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol 2090. Humana, New York, NY. 2020.
- LÓPEZ, A.; CARRERAS, C.; PASCUAL, M.; PEGUEROLES, C. Evaluating restriction enzyme selection for reduced representation sequencing in conservation genomics. **Molecular Ecology Resources**, 2023. John Wiley and Sons Inc.
- LOWE-MCCONELL, R. H. *Fish Communities in Tropical Freshwaters. Their distribution, ecology and evolution.* New York, 1975.
- LUDWIG, S.; PIMENTEL, J. DA S. M.; CARDOSO RESENDE, L.; KALAPOTHAKIS, E. Eco-evolutionary factors that influence its demographic oscillations in *Prochilodus costatus* (Actinopterygii: Characiformes) populations evidenced through a genetic spatial–temporal evaluation. *Evolutionary Applications*, v. 16, n. 4, p. 895–910, 2023.
- LUJAN, N. K.; WEIR, J. T.; NOONAN, B. P.; LOVEJOY, N. R.; MANDRAK, N. E. Is Niagara Falls a barrier to gene flow in riverine fishes? A test using genome-wide SNP data from seven native species. **Molecular Ecology**, v. 29, n. 7, p. 1235–1249, 2020.
- MACHADO, C. **Aspectos reprodutivos do dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) (teleostei, characidae) na região do Alto Rio Uruguai, Brasil.** 2003. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- MALLET, J. Hybridization, ecological races and the nature of species: Empirical evidence for the ease of speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1506, p. 2971–2986, 2008.
- MAMOOZADEH, N. R.; GRAVES, J. E.; MCDOWELL, J. R. Genome-wide SNPs resolve spatiotemporal patterns of connectivity within striped marlin (*Kajikia audax*), a broadly distributed and highly migratory pelagic species. *Evolutionary Applications*, v. 13, n. 4, p. 677–698, 2020.
- MARIANI, S.; BEKKEVOLD, D. *The Nuclear Genome: Neutral and Adaptive Markers in Fisheries Science.* Second Edition. Elsevier, 2013.
- MARQUES, A.; FONTANA, C.S.; VÉLEZ, E.; BENCKE, G.A.; SCHNEIDER, M.; REIS, R.E. Lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, **Publicações avulsas FZB**, p. 52, 2002.

- MASSARO, M. V.; FELDEN, J.; PACHLA, L. A.; ANTONETTI, D. A.; REYNALTE-TATAJE, D. A. Length-weight relationship of 13 middle Uruguay River basin species, Southern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 36, n. 3, p. 361–363, 2020.
- MASTROCHIRICO-FILHO, V. A.; PAZO, F. DEL; HATA, M. Assessing genetic diversity for a pre-breeding program in *Piaractus mesopotamicus* by SNPs and SSRs. **Genes**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2019.
- MCBRIDE, R. S. The Continuing Role of Life History Parameters to Identify Stock Structure. Second Edition. Elsevier, 2013.
- MENDONÇA, F.; DANNI-OLIVERA, I. M. Climatologia - Noções Básicas e Climas do Brasil. **São Paulo: Oficina de Textos**, p. 540, 2007.
- MIJANGOS, J. L.; GRUBER, B.; BERRY, O.; PACIONI, C.; GEORGES, A. (2022). dartR v2: An accessible genetic analysis platform for conservation, ecology and agriculture. **Methods in Ecology and Evolution**, 2022.
- MONTEIRO, M. A. Caracterização climática do estado de Santa Catarina: uma abordagem dos principais sistemas atmosféricos que atuam durante o ano. **Geosul**, v. 16, n. 31, p. 69 - 78, 2001.
- MOORE, J. S.; BOURRET, V.; DIONNE, M.; et al. Conservation genomics of anadromous Atlantic salmon across its North American range: Outlier loci identify the same patterns of population structure as neutral loci. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 23, p. 5680–5697, 2014.
- MORIN, P. A.; LUIKART, G.; WAYNE, R. K. SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 4, p. 208–216, 2004.
- MORIN, P. A.; MARTIEN, K. K.; TAYLOR, B. L. Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 66–73, 2009.
- MOUNIC-SILVA, C. E.; LOPES, C. A.; PORTO-FERREIRA, L. B.; et al. Spawning and recruitment areas of migratory fish in the Uruguay river: Applying for rivers connectivity conservation in South America. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 3, 2019.
- NAVAJAS, M. J.; THISTLEWOOD, H. M. A.; LAGNEL, J.; HUGHES, C. Microsatellite sequences are under-represented in two mite genomes. **Insect Molecular Biology**, v. 7, n. 3, p. 249–256, 1998.
- NERY, J. T. Dinâmica climática da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 1, p. 61 – 75, 2005.
- O'FARRELL, I.; BORDET, F.; CHAPARRO, G. Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: Validation of dominant eco-strategies. **Hydrobiologia**, v. 698, n. 1, p. 175–190, 2012.
- O'MALLEY, K. G.; CAMARA, M. D.; BANKS, M. A. Candidate loci reveal genetic differentiation between temporally divergent migratory runs of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Molecular Ecology**, v. 16, n. 23, p. 4930–4941, 2007.
- O'MALLEY, K. G.; JACOBSON, D. P.; KURTH, R.; DILL, A. J.; BANKS, M. A. Adaptive genetic markers discriminate migratory runs of Chinook salmon (*Oncorhynchus*

- tshawytscha) amid continued gene flow. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 8, p. 1184–1194, 2013.
- O'MALLEY, K. G.; VAUX, F.; BLACK, A. N. Characterizing neutral and adaptive genomic differentiation in a changing climate: The most northerly freshwater fish as a model. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 2004–2017, 2019. John Wiley and Sons Ltd.
- OROZCO, G.; NARVÁEZ, J. Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena River basin and its tributaries, Colombia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 37–45, 2014.
- PAPADOPOULOU, A.; KNOWLES L. Toward a paradigm shift in comparative Phylogeography driven by trait-based hypotheses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 113, p. 8018–8024, 2016.
- PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, A. A. Fish-passage facilities as ecological traps in large neotropical rivers. *Conservation Biology*, v. 22, n. 1, p. 180–188, 2008.
- PEMBLETON L.; COGAN, N.; FORSTER, J. StAMPP: an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 5, p. 946 - 952, 2013.
- 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.
- PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; et al. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 1039–1050, 2008.
- POMPEU, P. D. S.; GODINHO, H. P. Effects of extended absence of flooding on the fish assemblages of three floodplain lagoons in the middle São Francisco River, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 4, n. 4, p. 427–433, 2006.
- PRIVÉ, F.; LUU, K.; VILHJÁLMSSON, B. J.; BLUM, M. G. B.; ROSENBERG, M. Performing Highly Efficient Genome Scans for Local Adaptation with R Package pcadapt Version 4. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 7, p. 2153–2154, 2020.
- PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; THOMAS, L.; FERREIRA, M. A.; BENDER, D.; MALLER, J.; SKLAR, P.; DE BAKKER, P. I.; DALY, M. J.; SHAM, P. C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **American journal of human genetics**, v. 81, n. 3, p. 559–575, 2007.
- RAMELLA, M. S.; KROTH, M. A.; MEURER, S.; et al. Genetic variability in four fish species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 589–598, 2006.
- RAMIREZ, J. L.; MACHADO, C. B.; DE MELLO AFFONSO, P. R. A.; GALETTI, P. M. Speciation in Coastal Basins Driven by Staggered Headwater Captures: Dispersal of a Species Complex, *Leporinus bahiensis*, as Revealed by Genome-wide SNP Data. **Systematic Biology**, v. 72, n. 5, p. 973–983, 2023. Oxford University Press.

- RASAL, K. D.; CHAKRAPANI, V.; PANDEY, A. K.; et al. Status and future perspectives of single nucleotide polymorphisms (SNPs) markers in farmed fishes: Way ahead using next generation sequencing. **Gene Reports**, v. 6, p. 81–86, 2017.
- REYNALTE-TATAJE, D.; AGOSTINHO, A. A.; BIALETZKI, A.; et al. Spatial and temporal variation of the ichthyoplankton in a subtropical river in Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 94, n. 2, p. 403–419, 2012.
- REYNALTE-TATAJE, D. A.; NUÑER, A. P. O.; NUNES, M. C.; et al. Spawning of migratory fish species between two reservoirs of the upper Uruguay river, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 4, p. 829–835, 2012.
- RHIE, A.; MCCARTHY, S. A.; FEDRIGO, O.; et al. Towards complete and error-free genome assemblies of all vertebrate species. **Nature**, v. 592, n. 7856, p. 737–746, 2021.
- RIBOLLI, J. Caracterização genética populacional do dourado, *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae, Salmininae) na Bacia do alto e médio rio Uruguai. 2014. Dissertação (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- RIBOLLI, J.; HOEINGHAUS, D. J.; JOHNSON, J. A.; 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. Springer Netherlands.
- RIBOLLI, J.; ZANIBONI-FILHO, E.; MACHADO, C. B.; et al. Anthropogenic river fragmentation reduces long-term viability of the migratory fish *salminus brasiliensis* (Characiformes: Bryconidae) populations. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 2, p. 1–17, 2021.
- ROBLEDO, D.; PALAIOKOSTAS, C.; BARGELLONI, L.; MARTÍNEZ, P.; HOUSTON, R. Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. **Reviews in Aquaculture**, 2018.
- ROFF, D. Evolutionary Quantitative Genetics. Chapman & Hall, New York, 1997.
- ROSA, R.S.; LIMA, F.C.T. Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. In MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P. Livro Vermelho da Fauna Brasileira ameaçada de extinção - 1.ed. - Brasília, DF: MMA; **Biodiversitas**, v. 2, p. 1420, 2008.
- RUEDA, E. C.; CARRIQUIRIBORDE, P.; MONZÓN, A. M.; SOMOZA, G. M.; ORTÍ, G. Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. **Genetica**, v. 141, n. 7–9, p. 401–407, 2013.
- RUSSELLO, M. A.; KIRK, S. L.; FRAZER, K. K.; ASKEY, P. J. Detection of outlier loci and their utility for fisheries management. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 1, p. 39–52, 2012.
- SANCHES, A.; GALETTI, P. M.; GALZERANI, F.; et al. Estructura genética poblacional de dos especies de peces migratorios de agua dulce (*Brycon orthotaenia* y *Prochilodus argenteus*) en la cuenca del Río San Francisco (Brasil) y su importancia para la conservación. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 40, n. 1, p. 177–186, 2012.
- SARTORI, M. G. B. A dinâmica do clima do Rio Grande do Sul: indução empírica e conhecimento científico. **Terra Livre**, v. 1, n. 20, p. 27 - 49, 2003.

- SCHORK, G. **Estrutura da assembleia íctica nos dez anos após a formação dos reservatórios de Itá e Machadinho – Alto Rio Uruguai**. 2010. Dissertação (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- SEDDON, J. M.; PARKER, H. G.; OSTRANDER, E. A.; ELLEGREN, H. SNPs in ecological and conservation studies: A test in the Scandinavian wolf population. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 2, p. 503–511, 2005.
- SEEB, J. E.; CARVALHO, G.; HAUSER, L.; et al. Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. SUPPL. 1, p. 1–8, 2011.
- SHAKLEE, J. B.; BEACHAM, T. D.; SEEB, L.; WHITE, B. A. Managing fisheries using genetic data case studies. **Fisheries Research**, v. 43, p. 45–78, 1999.
- SHERMAN, K. D.; PARIS, J. R.; KING, R. A.; et al. RAD-Seq Analysis and in situ Monitoring of Nassau Grouper Reveal Fine-Scale Population Structure and Origins of Aggregating Fish. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, n. March, p. 1–15, 2020.
- SHI, H.; WANG, X.; LU, Z.; et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N 6-methyladenosine-modified RNA. **Cell Research**, v. 27, n. 3, p. 315–328, 2017.
- SILLIMAN, K. Population structure, genetic connectivity, and adaptation in the Olympia oyster (*Ostrea lurida*) along the west coast of North America. **Evolutionary Applications**, v. 12, n. 5, p. 923–939, 2019.
- SILVA, R. N. **Diversidade espacial e temporal da ictiofauna do alto rio Uruguai: aliando técnicas de geoprocessamento**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- SKOVRIND, M.; OLSEN, M. T.; VIEIRA, F. G.; et al. Genomic population structure of freshwater-resident and anadromous ide (*Leuciscus idus*) in north-western Europe. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 4, p. 1064–1074, 2016.
- SMITH, J. M.; HAIGH, J. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetical Research*, v. 23, n. 1, p. 23–35, 1974.
- SUN, S.; HU, Z.; LU, Z.; et al. Genetic Diversity and Population Structure of Hemiculter leucisculus (*Basileichthys*, 1855) in Xinjiang Tarim River. **Genes**, v. 13, n. 10, 2022.
- SOARES, M. DA L.; MASSARO, M. V.; HARTMANN, P. B.; et al. The main channel and river confluences as spawning sites for migratory fishes in the middle Uruguay River. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, n. 3, p. 1–16, 2022.
- SOTERO-SANTOS, R. B.; CARVALHO, E. G.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J.; ROCHA, O. Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil). **Harmful Algae**, v. 7, n. 5, p. 590–598, 2008.
- STACEY, N. E. Control of the Timing of Ovulation by Exogenous and Endogenous Factors. In G. W. POTTS & R. J. WOOTON (Eds.), *Fish reproduction. Strategies and Tactics*. p. 207–222, 1984. London.

- STOREY, J. D.; BASS, A. J.; DABNEY, A.; ROBINSON, D. qvalue: Q-value estimation for false discovery rate control. R package version 2.12.0. Retrieved from <http://github.com/jdstorey/qvalue>, 2018.
- SVERLIJ, S.B.; ESPINACH R. A. El dorado, *Salminus maxillosus* (Pisces, Characiformes) en el Río de La Plata Y Río Uruguay inferior. **Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero**, v. 6, p. 57 - 75, 1986.
- TORATI, L. S.; TAGGART, J. B.; VARELA, E. S.; et al. Genetic diversity and structure in *Arapaima gigas* populations from Amazon and Araguaia-Tocantins river basins. **BMC Genetics**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2019.
- VAUX, F.; BOHN, S.; HYDE, J. R.; O'MALLEY, K. G. Adaptive markers distinguish North and South Pacific Albacore amid low population differentiation. **Evolutionary Applications**, v. 14, n. 5, p. 1343–1364, 2021. John Wiley and Sons Inc.
- VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275–305, 2002.
- WINEMILLER, K. O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia**, v. 81, n. 2, p. 225–241, 1989.
- WINEMILLER, K. O.; MCINTYRE, P. B.; CASTELLO, L.; et al. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. *Science*, v. 351, n. 6269, p. 128–129, 2016.
- XING, C.; SCHUMACHER, F. R.; XING, G.; et al. Comparison of microsatellites, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and composite markers derived from SNPs in linkage analysis. **BMC Genetics**, v. 6, n. SUPPL.1, p. 1–5, 2005.
- YEAMAN, S.; WHITLOCK, M. The genetic architecture of adaptation under migration-selection balance. **Evolution**, v. 65, p. 1897–1911, 2011.
- YING, Y.; CHEN, Y.; LIN, L.; GAO, T. Risks of ignoring fish population spatial structure in fisheries management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 68, n. 12, p. 2101–2120, 2011.
- ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory fishes of the Uruguay River. In CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Ed.). *Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status*. **World Fisheries** v. 1, p. 372, 2003.
- ZANIBONI-FILHO, E.; RIBOLLI, J.; HERMES-SILVA, S.; NUÑER, A. P. O. Wide reproductive period of a long-distance migratory fish in a subtropical river, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2017.
- ZAYAS, M.A.; CORDIVIOLA, E. The conservation state of characidae fishes (Pisces: Characiformes) in of the plata basin, Argentina. **Gayana**, v. 71, n. 2, p.178 - 186, 2007.
- ZHANG, B. D.; LI, Y. L.; XUE, D. X.; LIU, J. X. Population Genomics Reveals Shallow Genetic Structure in a Connected and Ecologically Important Fish From the Northwestern Pacific Ocean. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, n. May, p. 1–11, 2020.

ZHANG, K.; ZHOU, Y.; SONG, W.; JIANG, L.; YAN, X. Genome-Wide RADseq Reveals Genetic Differentiation of Wild and Cultured Populations of Large Yellow Croaker. **Genes**, v. 14, n. 7, 2023.

ZHAO, L.; QU, F.; SONG, N.; et al. Population genomics provides insights into the population structure and temperature-driven adaptation of *Collichthys lucidus*. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 2021. BMC Genomics.

ZHAO, F.; GUO, L.; ZHANG, N.; et al. Genetic Diversity Analysis of Different Populations of *Lutjanus kasmira* Based on SNP Markers. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 10, n. 10, 2022.

ZIMMERMAN, S. J.; ALDRIDGE, C. L.; OYLER-MCCANCE, S. J. An empirical comparison of population genetic analyses using microsatellite and SNP data for a species of conservation concern. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1–16, 2020. BMC Genomics.

## IX. MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela S1.** Outputs do demultiplexing (Passo 1) do pipeline lpyrad v. 0.9.5. Observe que o barcode identificador não foi reconhecido para muitos reads contidos no zip R2.

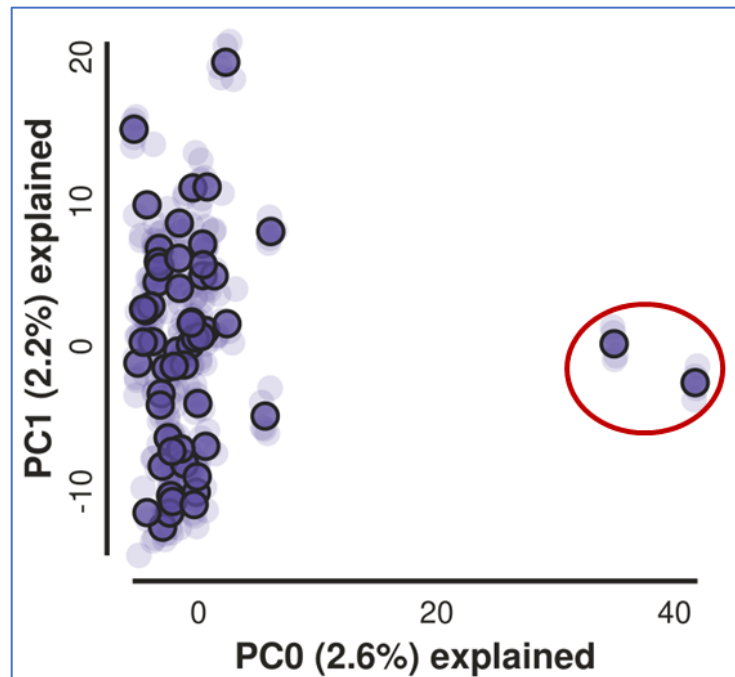
Arquivo bruto	# total de reads	Corte encontrado	Barcode encontrado
<b>EM163GBS_EM150_S1_L001_R1_001.fastq</b>	527609798	527265070	413008617
<b>EM163GBS_EM150_S1_L001_R2_001.fastq</b>	527609798	518208290	<b>15211</b>

**Tabela S2.** Número total de reads sequenciados por cada indivíduo de *S. brasiliensis* obtidos depois do demultiplexing (em vermelho, amostras descartadas pela baixa informação contida em comparação com os demais indivíduos)

Indivíduo	Reads totais
lta_1764	9797762
lta_1765	9407798
lta_1768	11067691
lta_1769	9544941
lta_1770	11552194
lta_1771	11543870
lta_1772	13154022
lta_1773	7515867
lta_1777	9821669
lta_1781	8052480
lta_1794	9584116
lta_1797	8652769
lta_1801	10562174
lta_1821	9143496
lta_1822	8209679
lta_1826	9911659
lta_1845	9745138
lta_1847	9610821
lta_1848	7782885
<b>lta_1851</b>	<b>76196</b>
lta_1876	5690028
lta_1877	11852980
<b>lta_1879</b>	<b>93727</b>
lta_1880	7840010
lta_1881	8728194
lta_1883	6241841
lta_1886	10154713
lta_1887	8198400
lta_1894	11318461

Ita_1900	9491650
Tur_2063	8645353
Tur_2064	5285000
Tur_2065	10079368
Tur_2067	8581441
Tur_2072	7500961
Tur_2073	3071930
Tur_2076	8952874
Tur_2078	8327235
Tur_2079	3975840
Tur_2081	8499470
Tur_2084	3905952
Tur_2087	3659441
Tur_2084	3145833
Tur_2087	1556771
Tur_2094	1805773
Tur_2102	3499277
Tur_2103	5609271
Tur_2104	7972717
Tur_2105	4144530
Tur_2106	4101268
Tur_2152	2325301
Tur_2153	4439405
Tur_2154	2161179
Tur_2158	2734896
Tur_2161	3296732
Tur_2164	1948191
Tur_2165	7752884
Tur_2171	5178471
Tur_2175	3093960
Tur_2176	3425273

**Figura S1.** Análises de PCA para 13 614/16 166 SNPs dos 58 indivíduos de *S. brasiliensis*. Os indivíduos sinalados correspondem as amostras Tur\_2103 e Tur\_2165, as quais foram consideradas como indivíduos introduzidos e, portanto, retirados das análises posteriores



**Figura S2.** Gráfico dos câmbios na relação gonadosomática no dourado *Salminus brasiliensis* do alto rio Uruguai entre 1998 - 2002(Tomado e adaptado de Machado, 2003). No seu estudo foram identificados dois picos de desova, os quais foram considerados para classificar nossos indivíduos como “primeiros reprodutores” (Early) e “reprodutores tardios”(Late).

