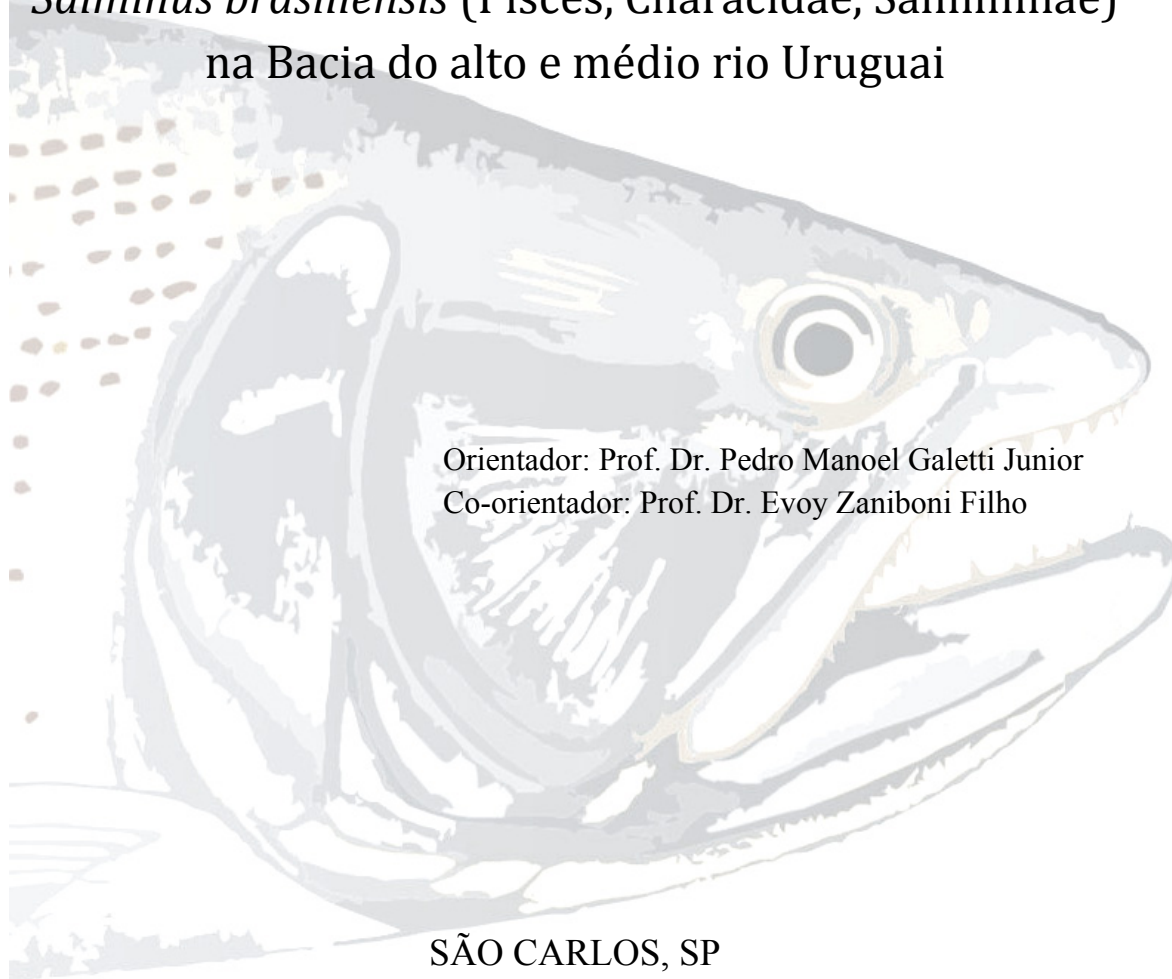


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS

JOSIANE RIBOLLI

Caracterização genética populacional do dourado,  
*Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae, Salmininae)  
na Bacia do alto e médio rio Uruguai



Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior  
Co-orientador: Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho

SÃO CARLOS, SP  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS

TESE DE DOUTORADO

Caracterização genética populacional do dourado,  
*Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae, Salmininae)  
na Bacia do alto e médio rio Uruguai

JOSIANE RIBOLLI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências com área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior  
Co-orientador: Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho

SÃO CARLOS, SP  
2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R486cg Ribolli, Josiane.  
Caracterização genética populacional do dourado,  
*Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae, Salmininae) na  
Bacia do alto e médio rio Uruguai / Josiane Ribolli. -- São  
Carlos : UFSCar, 2014.  
105 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2014.

1. Genética de populações. 2. Peixe migrador. 3. Sistema  
de acasalamento. 4. Manejo pesqueiro. 5. Estrutura  
genética. I. Título.

CDD: 575.15 (20<sup>a</sup>)

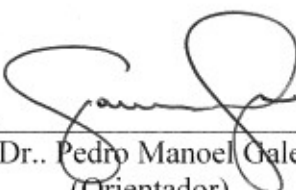
**JOSIANE RIBOLLI**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Aprovada** em 01 de abril de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr.. Pedro Manoel Galetti Júnior  
(Orientador)

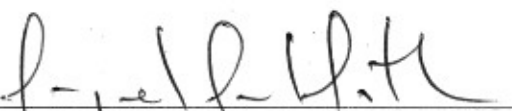
1º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Orlando Moreira Filho  
PPGGEV/UFSCar

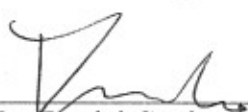
2º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas  
PPGGEV/UFSCar

3º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Angelo Antonio Agostinho  
UEM/Maringá-PR

4º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Daniel Cardoso de Carvalho  
PUC/B. Horizonte-MG

Dedico este trabalho aos meus grandes  
amores: Dennis e minha mãe!!

*“ALGUMAS PALAVRAS...*

*Se você, prezado colega, ficou 32 anos às margens de um rio, de um lago ou nas entranhas de uma floresta...pesquisando...reunindo dados e mais dados sobre uma questão da Natureza.*

*Se você se ocupou, de modo útil, durante todo o seu tempo e com a mente no sentido elevado, tentando compreender a Vida.*

*Se você conseguiu, laboriosamente, redigir um trabalho, um livro, com a alma cheia de esperanças.*

*Se você, confiantemente, procurou amigos, procurou pessoas com poder executivo para entenderem e apoiarem sua obra... e quase todos eles, com um sorriso de malícia, lhe devolveram o seu trabalho... e lhe disseram: - que pena! Não temos recursos para publicá-lo.... ou que uma vírgula não estava no lugar certo... continue a lutar, a lutar, até conseguir ver o seu desiderato satisfeito: - a publicação de sua obra!*

*Lute e insista por um ano, por dez e por doze anos... e muito mais, se for preciso, porque na história dos homens, a ocorrência dos fatos chega a ser quase uma rotina através dos tempo: - poucos, verdadeiramente, ajudam e cooperam altruisticamente; grande parte das pessoas, corroídas por inveja, por ciúmes e por outros sentimentos pobres, procuram sempre atrapalhar as coisas boas e que estão fora do alcance delas!*

*Não se engane com a posição de pessoas, pois, com frequência, aquelas que estão no alto e que poderiam nos ajudar... são as primeiras que mais nos atrapalham.*

*- lute e persista, porque você há de vencer!  
Assim aconteceu comigo.”*

M. P. de Godoy,  
Pirassununga, 16.1.1975

## AGRADECIMENTOS

Uma parte de mim nestes últimos anos está refletida neste trabalho e é uma grande alegria e responsabilidade agradecer a inúmeras pessoas que estiveram comigo nesta etapa:

-Aos meus pais, ao amor que fez com que me lançassem mundo a fora, mudando completamente as possibilidades da minha vida;

-Ao meu companheiro Dennis, por me incentivar e me apoiar, apesar de minhas ausências constantes e por vezes longas;

-Ao meu orientador Pedro Galetti, pela oportunidade e confiança em mim depositadas, e pelo grande aprendizado durante o este período do doutorado;

-Ao meu co-orientador Evoy Zaniboni Filho, pela parceria, amizade, conselhos e exemplo;

-Ao LAPAD/UFSC pela infraestrutura disponibilizada para a coleta das amostras;

Aos colegas e amigos do LAPAD especialmente ao Pedro pela imensa ajuda nas coletas, ao David por colaborar de modo intenso na realização de todas as etapas desta tese;

-Às minhas amigas Kátia, Jaque, Michy, Simoni, Valéria Mendes, Rafaela Favoreti e Rafaela Sampaio pelo apoio, amizade e incentivo;

-Aos pescadores: Chico, Geraldo, Amarildo, Edvan e Minella pela colaboração;

-Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela oportunidade da realização do doutorado e aos seus funcionários (João, Roseli e Madalena);

-À todos os amigos e colegas do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação, em especial a Fernanda, por me auxiliar com toda a papelada burocrática; a Profa. Patricia; aos amigos Aline, Aline, Ueslei por suas ricas contribuições na correção e sugestões no texto; Andiará, Eliana, Adriana, Carla, Dany, e tantos outros colegas, pela parceria no trabalho e nos momentos alegres em São Carlos;

-À minha estagiária Tailise, uma querida que sempre esteve pronta para me ajudar;

-Às minhas amigas e companheiras de curso Simoni e Eliziane, por me acolherem sempre em sua casa;

-À todos os meus amigos e familiares pelo incentivo;

-À minha grande amiga e colega Ana Paula Ferrari Hoeninghaus que me deu todo o apoio possível para eu realizar o estágio;

- À CAPES pela bolsa concedida e pela oportunidade do doutorado sanduíche (processo número 1592-81-2);
- Ao meu co-orientador estrangeiro David J. Hoeninghaus que abriu as portas de seu Lab e me recebeu de maneira ímpar na Universidade do Norte do Texas (USA);
- Ao prof. Dr. Jeff Johnson da Universidade do Norte do Texas (USA) pela colaboração nas análises e discussão dos resultados;
- À Dra. Carolina Miño pela colaboração nas análises de parentesco;
- Ao SISBIOTA e ao CNPq pelo apoio financeiro;
- E ao dourado, personagem principal dessa história!!



## RESUMO

*Salminus brasiliensis* (CUVIER, 1816) está distribuído em diversas bacias hidrográficas da América do Sul. Conhecido popularmente como dourado, é uma espécie de grande porte e com importância econômica e social para a pesca artesanal e esportiva. Frente à necessidade de conservação biológica e a falta de conhecimento sobre a estrutura genética de peixes migradores Neotropicais, o presente estudo teve como objetivos inferir sobre o sistema de acasalamento e os parâmetros genéticos populacionais de *S. brasiliensis* da bacia do alto e médio rio Uruguai, Brasil. Populações de indivíduos adultos foram amostradas durante dois períodos reprodutivos e dois períodos não-reprodutivos na bacia do alto e médio rio Uruguai, e larvas da espécie foram obtidas de uma desova natural na região do alto rio Uruguai. As análises para inferir parâmetros de diversidade genética, estrutura populacional e estimativa de parentesco foram realizadas por meio de marcadores microssatélites. Todas as populações avaliadas no presente estudo apresentaram elevados valores de diversidade genética. Para o primeiro período reprodutivo foram identificadas quatro populações estruturadas geneticamente, uma correspondendo ao início da temporada de reprodução, duas ao período intermediário e uma ao fim da estação de desova. As populações analisadas no período não-reprodutivo exibiram diferenciação entre os dois anos analisados. Tanto as populações correspondentes ao período reprodutivo quanto as do não-reprodutivo não exibiram isolamento por distância no trecho a jusante da UHE Itá. Não foi identificado gargalo populacional nas populações amostrais da região fragmentada por barragens, porém, as populações sob influência dos barramentos apresentaram pequenos tamanhos populacionais efetivos. Identificamos ausência de estruturação genética entre as populações amostrais situadas a jusante e a montante da Usina Hidrelétrica (UHE) Machadinho e diferenciação entre as populações amostrais a jusante e a montante da UHE Itá, decorrente, possivelmente, da barreira geográfica preexistente no rio Uruguai, conhecida como Estreito Augusto César Gorge. As análises de parentesco indicaram que múltiplos machos e fêmeas participaram efetivamente durante a reprodução e a desova de *S. brasiliensis* avaliada em ambiente natural. Os resultados do presente estudo constituem novas descobertas sobre o sistema de acasalamento e modo de organização durante o período reprodutivo e não-reprodutivo de *S. brasiliensis*. Essas informações devem ser levadas em consideração para tomadas de decisão sobre programas de manejo da pesca, para a amostragem de reprodutores para programas de repovoamento.

## ABSTRACT

*Salminus brasiliensis* (CUVIER, 1816) is distributed in several basins of South America. Commonly known by dourado, is a large fish and economical and social importance for artisanal and sport fishing. Due to the necessity of conservation and the absence of knowledge about the genetic structure of Neotropical migratory fish, the present study aimed to infer about the mating system and population genetic parameters of *S. brasiliensis* from the upper and middle Uruguay River basin. Populations of adult individuals were sampled during two years in the reproductive and non-reproductive periods in the upper and middle river Uruguay. The larvae of this species were obtained from natural spawning in the upper Uruguay River basin. Genetic analyses were performed using microsatellite markers to infer parameters of genetic diversity, population structure and estimation of kinship. All populations evaluated in this study showed high levels of genetic diversity. For the first reproductive period four genetically distinct populations were identified, one corresponding to the beginning of breeding season, two to the intermediate period and one to the end of the spawning season. The populations analyzed during the non-reproductive period were genetically different between the two years of study. Both populations of reproductive and non-reproductive period did not reveal any isolation by distance in the downstream of HPP Itá area. No bottleneck effect was observed in the populations sampled in the region fragmented by hydroelectric dams; however, the populations under the influence of the dams presented small effective population sizes. The results revealed no genetic structure among populations situated upstream and downstream of the Hydroelectric Power Plant (HPP) Machadinho and a particular differentiation between populations sampled upstream and downstream the HPP Itá, due, probably, of the barrier resulting from the preexisting of geographical barrier in the Uruguay River, Augusto César Gorge. The analyses of kinship indicated that multiple males and females participated effectively during reproduction and spawning of *S. brasiliensis* evaluated in the environment. The findings of this study provide new insights into the mating system and mode of organization during the reproductive and non-reproductive period of *S. brasiliensis*. This information must be taken into account in decisions about fisheries management programs and in broodstock samplings and for restocking programs.

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

<b>1.1 INTRODUÇÃO</b> .....	2
IMPACTOS DAS FRAGMENTAÇÕES SOBRE OS ECOSISTEMAS DE ÁGUA DOCE.....	2
DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA: ÊNFASE EM PEIXES MIGRADORES .....	3
MIGRAÇÕES REPRODUTIVAS EM PEIXES NEOTROPICAIS.....	5
<b>1.2 ESPÉCIE DE ESTUDO</b> .....	8
<b>1.3 HIPÓTESES</b> .....	11
1.4.1 OBJETIVO GERAL.....	12
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
A BACIA DO RIO URUGUAI.....	13
<b>2. Isolamento por tempo (IBT) em populações de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>) na bacia do alto e médio rio Uruguai</b> .....	18
2.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1.1 Amostragem.....	18
2.1.2 Extração do DNA e amplificação dos locos de microsatélites .....	19
2.1.3 Estimativa dos níveis de diversidade genética e estruturação populacional .....	20
2.2 RESULTADOS.....	22
2.2.1 Diversidade genética e estrutura populacional .....	22
Estruturação Espacial.....	28
2.3 DISCUSSÃO .....	37
<b>3. Estrutura genética em populações não-reprodutivas de dourado, (<i>Salminus brasiliensis</i>) na bacia do alto e médio rio Uruguai</b> .....	43
3.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	43
3.1.1 Amostragem.....	43
3.1.2 Extração do DNA e amplificação dos locos de microsatélites .....	44
3.1.3 Estimativa dos níveis de diversidade genética e estruturação populacional .....	45
3.2 RESULTADOS .....	46
3.2.1 Diversidade genética e estrutura populacional .....	46
3.3 DISCUSSÃO .....	53

<b>4. Impactos dos barramentos hidrelétricos sobre a diversidade genética e estruturação populacional de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>) na bacia do alto rio Uruguai</b> .....	58
4.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	58
4.1.1 Amostragem.....	58
4.1.2 Extração do DNA e amplificação dos locos de microsatélites .....	59
4.1.3 Estimativa dos níveis de diversidade genética e estruturação populacional .....	59
4.2 RESULTADOS .....	61
4.2.1 Diversidade genética e estrutura populacional .....	61
4.3 DISCUSSÃO .....	65
<b>5. Sistema de acasalamento de <i>Salminus brasiliensis</i> inferido a partir da reconstrução de parentesco baseado em larvas obtidas de uma desova natural</b> .....	71
5.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	71
5.1.1 Área de estudo e amostragem das progênies .....	71
5.1.2 Extração do DNA e amplificação dos locos de microsatélites .....	72
5.1.3 Análise estatística dos dados.....	73
5.2 RESULTADOS .....	74
5.3 DISCUSSÃO .....	76
<b>CONCLUSÕES</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	82
<b>Anexos</b> .....	97
<b>Apêndices</b> .....	99

# INTRODUÇÃO



## 1.1 INTRODUÇÃO

### IMPACTOS DAS FRAGMENTAÇÕES SOBRE OS ECOSISTEMAS DE ÁGUA DOCE

A diversidade biológica ou a biodiversidade é a ‘variedade de vida’ e refere-se à variação existente em todos os níveis de organização biológica: ecossistema, espécie e recurso genético (GASTON; SPICER, 2009). No ano de 1992 a Convenção sobre Diversidade Biológica (CBD) definiu biodiversidade como “*A variabilidade entre os organismos vivos de todas as origens incluindo, entre outros, terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte, o que inclui a diversidade dentro das espécies, entre espécies e de ecossistemas*” (MMA, 2000). A biodiversidade é muito importante pois fornece o suporte para os processos-chave que afetam diretamente os serviços do ecossistema (MACE *et al.*, 2012).

Os ecossistemas de água doce, como os rios, riachos, lagos e zonas úmidas apresentam uma biodiversidade elevada. Abrigam pelo menos 10% de todas as espécies animais conhecidas e um terço de todas as espécies de vertebrados, incluindo ao menos 40% dos peixes de todo o planeta (POFF *et al.*, 2012). Demandas humanas de ecossistemas de água doce têm aumentado acentuadamente em relação ao século passado, contribuindo para a prosperidade e o bem-estar humanos mas, em contrapartida, têm conduzido a uma crescente ameaça à biodiversidade em todo o mundo (DUDGEON *et al.*, 2006). As mais diversas alterações causadas pelo homem no ecossistema têm comprometido particularmente a fauna de água doce, que atualmente apresenta um número desproporcional de espécies ameaçadas (STRAYER; DUDGEON, 2010).

As modificações nos ambientes de água doce, decorrentes de atividades humanas, vêm acontecendo ao longo da história. Dentre elas destacam-se como as principais, a superexploração, a poluição, a alteração do fluxo da água, a destruição ou degradação de habitat e a invasão de espécies (ALLAN; FLECKER, 1993; POFF *et al.*, 2012). A construção de usinas hidrelétricas e suas consequências associadas são consideradas como as principais ameaças à biodiversidade de água doce (DUDGEON *et al.*, 2006; VÖRÖSMARTY *et al.*, 2010). Os efeitos negativos decorrentes da fragmentação ocasionada pela construção de barramentos e a alteração de habitat são inúmeros, como a perda da riqueza de espécies; alteração na abundância e distribuição das populações, redução da diversidade genética, entre tantos outros (QUINN; HARRISON, 1988; KNUTSON *et al.*, 1999; KELLER; LARGIADER, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2004). O represamento de um rio é um processo

tão intenso e dramático que resulta na formação de um novo ecossistema (BAXTER, 1977), isola segmentos adjacentes do rio e, ainda, obstrui vias de dispersão dos organismos (SCHLOSSER; ANGERMEIER, 1995). As alterações decorrentes das fragmentações podem exercer efeitos devastadores sobre as espécies nativas, principalmente para as espécies migradoras ( AGOSTINHO *et al.*, 2008; FU *et al.*, 2012). Esse grupo de peixes, particularmente, necessita de habitats específicos (como ambientes lóticos para a desova) e vários estímulos ambientais (como o aumento da temperatura e da turbidez da água) para completarem os diferentes estágios reprodutivos (WELCOMME, 1992; AGOSTINHO *et al.*, 2004; AGOSTINHO *et al.*, 2008; DUGAN *et al.*, 2010). Adicionalmente, o gradiente de fragmentação longitudinal que ocorre nos rios exerce uma maior probabilidade de extinção em populações de peixes situados a montante do que a jusante dos barramentos (GOTELLI; TAYLOR, 1999).

#### DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA: ÊNFASE EM PEIXES MIGRADORES

A manutenção da diversidade genética é amplamente aceita como meta para o manejo de populações selvagens dos mais diversos grupos de organismos (LAIKRE *et al.*, 2005; PALSBOELL *et al.*, 2007; ROGERS; PEACOCK, 2012). A variação genética é a base da flexibilidade adaptativa em populações e influenciará a forma como os seus membros irão adaptar-se frente às alterações ambientais (TEMPLETON; 2004); constituindo-se portanto, o elemento chave para a persistência de populações e espécies ao longo do tempo evolutivo (FREEMAN; HERRON, 2004).

Aproximadamente 2,5% de todas as espécies de peixes realizam migrações (BINDER; COOKE; HINCH, 2011). Este comportamento favorece maior distribuição geográfica em relação às espécies residentes. Segundo Laikre *et al.* (2005), a maioria das espécies não são formadas por uma única população geneticamente homogênea, mas podem ser estruturadas em grupos de indivíduos. Para isso, diversos mecanismos são responsáveis, tanto individualmente como em conjunto, para a diferenciação de populações. Dentre esses mecanismos, podemos citar a habilidade de dispersão (DOHERTY *et al.*, 1995); adaptação local (SCHMIDT; RAND, 2001); fragmentação de habitats (YAMAMOTO *et al.*, 2004); isolamento por tempo (MAES *et al.*, 2006); isolamento por distância (BYRNE *et al.*, 2013); deriva genética e fluxo gênico (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

A grande maioria dos estudos em genética da conservação investiga a estrutura genética de peixes migradores seguindo modelos populacionais clássicos, como o modelo de

ilha, modelo trampolim ou isolamento por distância (IBD) (ROUSSET, 1997; TESSIER; BERNATCHEZ, 1999). No entanto, outros mecanismos podem ser responsáveis pela estruturação populacional de diferentes espécies. Sanches e Galetti Jr. (2007) identificaram estruturação populacional em piraputanga (*Brycon hilarii*) através de marcadores RAPD. Os autores atribuíram a diferenciação genética identificada à formação de cardumes reprodutivos, os quais se organizariam de modo a manter a integridade de suas subpopulações. Essa hipótese de diferenciação genética entre grupos de peixes durante a época de desova já foi aplicada para explicar agregação de outras espécies de peixes migradores (WASKO; GALETTI JR., 2002; HATANAKA; GALETTI JR., 2003; HATANAKA *et al.*, 2006).

A reprodução de peixes em diferentes momentos do período reprodutivo pode ocasionar um isolamento temporal (HENDRY *et al.*, 1999; HENDRY; DAY, 2005; HE, WANG, 2010). Este modo de estruturação ocorre quando as populações exibem sinais de desenvolvimento divergentes de tal forma, que a reprodução de cada população ocorre em diferentes momentos (COOLEY *et al.*, 2003; RUNDLE; NOSIL, 2005). Como consequência, o rompimento do sincronismo reprodutivo pode resultar no isolamento temporal de populações conspecíficas e levar à especiação (YAMAMOTO; SOTA, 2012). Um exemplo clássico de especiação ocorreu com as cigarras periódicas (*Magicalada* spp.), as quais podem ter derivado quando processos climáticos que causaram a emergência de subpopulações em anos inesperados, e cada uma dessas populações adotou um calendário de emergência (LLOYD; WHITE, 1976; COOLEY *et al.*, 2003). A assincronia temporal na dinâmica populacional, constituídas por subpopulações genéticas espacialmente estruturadas, é um componente fundamental do efeito portfólio em que a diversidade da subpopulação intercede na variabilidade e na dinâmica ao nível de espécies (SCHINDLER *et al.*, 2010).

Existe uma gama de exemplos sobre estruturação populacional em escalas temporais de anos ou décadas. Em curtas escalas de tempo, especificamente dentro do mesmo período de reprodução, populações compostas de uma mistura de indivíduos que se reproduzem em diferentes momentos podem resultar em subpopulações geneticamente distintas, as quais contribuem significativamente para a diversidade genética populacional (SIITONEN; GALL, 1989; HENDRY; DAY, 2005; MAES *et al.*, 2006; ROUMET *et al.*, 2013). O termo *isolation-by-time* (IBT), que aqui será chamado de isolamento por tempo, foi introduzido por Hendry *et al.* (1999) para descrever o fluxo gênico restrito entre indivíduos reproduzem em diferentes momentos dentro da mesma estação reprodutiva. Em IBT, muitas espécies apresentam indivíduos com tendência herdável para se reproduzirem em momentos específicos, e estes



indivíduos tendem a gerar descendentes com características similares, reduzindo o fluxo gênico (HENDRY *et al.*, 1999; HENDRY; DAY, 2005).

O mecanismo de isolamento por tempo pode explicar o modo de estruturação de peixes migradores Neotropicais, estando relacionadas a características reprodutivas (por exemplo: reproduzem apenas uma vez durante o período reprodutivo; apresentarem desova total; preferência por locais e condições ambientais específicas, e um logo período de reprodução), que podem gerar subpopulações geneticamente diferenciadas dentro de um mesmo período reprodutivo. Da mesma forma, o conceito de *spawning waves*, aqui tratado como ondas de desova, é aplicado a grupos ou cardumes de peixes geneticamente diferenciados, que desovam em um mesmo local, porém em diferentes momentos ou em momentos ligeiramente sobrepostos, dentro de um mesmo período reprodutivo (HAY, 1985; JØRGENSEN *et al.*, 2005a). O conceito IBT é mais amplo e é utilizado em estudos de estruturação genética de diversos grupos taxonômicos (HALKETT *et al.*, 2006; COULSON *et al.*, 2006; ROUMET *et al.*, 2013). Em contrapartida, ondas de desova é um conceito aplicado apenas para algumas espécies de migradores que se reproduzem em locais específicos (ex. JØRGENSEN *et al.*, 2005a; SO *et al.*, 2006; PUMITINSEE *et al.*, 2009).

## MIGRAÇÕES REPRODUTIVAS EM PEIXES NEOTROPICAIS

Os peixes migradores da América do Sul, como os Characiformes e Siluriformes particularmente, iniciam a migração reprodutiva mediante a interação de fatores endógenos e exógenos (BARBIERI *et al.*, 2000). Condições ambientais específicas, como o aumento da temperatura, do fluxo da água e da turbidez, são estímulos que desencadeiam a migração, que por sua vez estimulam a maturação gonadal e a desova (GODOY, 1975; VAZZOLER *et al.*, 1996). Segundo Lowe-McConnell (1975) os peixes das regiões tropicais apresentam estreita relação entre o período reprodutivo e o período de chuvas. Para que ocorra o sucesso da migração, os peixes também requerem algumas condições ambientais específicas, como um trecho fluvial com características lóticis (GODOY, 1975). Além desses requerimentos, o sucesso do recrutamento de peixes migradores ainda depende da presença e da acessibilidade a áreas de desova e habitats adequados de berçário (AGOSTINHO *et al.*, 1993; AGOSTINHO *et al.*, 2004).

As espécies de peixes que apresentam desova total exibem uma época de reprodução tão característica que, se o período de cheias for retardado ou insuficiente, a reprodução pode falhar naquele ano (WELCOMME, 1979; GODOY, 1975). As consequências nessas falhas na

reprodução por anos consecutivos podem levar à queda dos estoques pesqueiros, até à extinção das espécies (WOOTTON, 1990). A relação entre a reprodução, as variáveis ambientais e os fatores endógenos é bem documentada para os peixes teleósteos. Perturbações no ciclo reprodutivo regular de peixes migradores foram avaliadas por um período de 14 anos no rio Paraná, e revelaram uma diminuição significativa na abundância desse grupo de peixes. Esses resultados estão, possivelmente, associados à perturbação no seu ciclo reprodutivo regular, resultante da alteração nas características do pulso de inundação e fluxo da água na planície de inundação (ESPÍNOLA *et al.* 2013).

As espécies de peixes apresentam diversas estratégias reprodutivas (WINEMILLER; ROSE, 1992). Os peixes migratórios Neotropicais, também conhecidos como peixes de “piracema”, são espécies reofílicas, realizam migrações ao longo dos rios para se reproduzir (VAZZOLER; MENEZES, 1992). A maioria dessas espécies reproduzem várias vezes durante a vida, em intervalos que se repetem (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007); apresentam estações de desova bem definidas, elevada fecundidade e ausência de cuidado parental (LOWE-MCCONNELL, 1999; WINEMILLER, 2005). Os ovócitos são pequenos não adesivos (livres) e são carregados pela coluna da água (AZEVEDO, 1953; GODINHO *et al.*, 2010). Apesar do conhecimento sobre a biologia reprodutiva de diversas espécies de peixes migradores, informações sobre o modo reprodução em ambiente natural são escassos. O comportamento reprodutivo na natureza tem importante implicação na ecologia e estrutura genética de populações, contudo, essas inferências são muito difíceis de serem diagnosticadas apenas através de observações visuais. Técnicas moleculares são eficientes para acessar o sistema de acasalamento e o parentesco (GARANT; KRUIK, 2005; KANNO *et al.*, 2011). Além disso, análises de parentesco permitem inferir sobre o tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) (WANG, 2009), que é definido como o tamanho de uma população ideal, tendo a mesma taxa de variação genética aleatória ao longo do tempo (PALSTRA; RUZZANTE, 2008). Este pode ser mais um critério para definir o estado de conservação e o risco de extinção de espécies ou populações (FRANKHAM, 1995).

As características reprodutivas e o ambiente em que se encontram (rios caudalosos na maioria das vezes) tornam difíceis as observações acerca do comportamento reprodutivo e sobre o número de reprodutores que participam de um evento de desova de peixes migradores. Segundo Godoy (1975), no momento da desova de *Salminus brasiliensis* é possível visualizar machos e fêmeas nadando intensamente lado a lado, enquanto liberam seus gametas na coluna da água. De acordo com as observações feitas na natureza, *S. brasiliensis* dificilmente desova

sozinho, estando geralmente acompanhado de outras espécies migradoras, como *Prochilodus lineatus* (MORAIS FILHO; SCHUBART, 1955).

Durante o período reprodutivo é possível diferenciar machos e fêmeas de *S. brasiliensis*, pois estes primeiros exibem dimorfismo sexual, representado pelo aparecimento de espículas na nadadeira anal (GODOY, 1975). Informações sobre a desova de espécies de peixes migradores da América do Sul na natureza ainda são escassas e estão baseadas na identificação de ovos e larvas coletadas no ambiente natural (REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2012). Além disso, para praticamente todas das espécies migradoras, se desconhece qual a proporção sexual que ocorre durante a reprodução, e ainda, se os peixes estabelecem e monopolizam territórios durante a atividade reprodutiva. Um grupo de larvas obtido de uma desova natural, pode representar um grande número de parentais, originando famílias com poucas larvas relacionadas ou pode ser decorrência de um pequeno número de reprodutores, originando uma grande quantidade de larvas de irmãos completos (HERBINGER *et al.*, 1997).

## 1.2 ESPÉCIE DE ESTUDO

Pertencente ao gênero *Salminus* (Teleostei: Ostariophysii: Characiformes: Characidae) a espécie *S. brasiliensis* (CUVIER, 1816) já foi referida taxonomicamente como *S. maxillosus*, *S. cuvieri* e *S. orbignyianus*. No Brasil a espécie *S. brasiliensis* é conhecida popularmente como dourado e nos demais países da América do Sul é conhecido como dorado, dorada e pirayú (LIMA, 2006) (Figura 1.1). Com ampla distribuição geográfica, pode ser encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai, Alto Rio Chaparé e Mamoré, ambos na Bolívia, e nas bacias ligadas ao sistema lagunar da Lagoa dos Patos (MORAIS FILHO; SCHUBART, 1955; FROESE; PAULY, 2014).

**Figura 1.1.** Exemplar adulto de dourado, *Salminus brasiliensis* (CUVIER, 1816).



Fonte:

LAPAD/UFSC

É uma espécie com grande importância econômica e social para a pesca artesanal, de subsistência e esportiva. Muito apreciado por sua agressividade e voracidade, é uma das espécies mais procurada pelos pescadores. O dourado é uma espécie de grande porte, segundo Moraes Filho e Schubart (1975), machos podem atingir até 5 kg e fêmeas até 26 kg. Habita preferencialmente ambientes lóticos e encachoeirados, e durante o maior período do ano têm vida solitária (ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003). Apresenta alta capacidade migratória, com relatos de movimentos ascendentes de 51,4 km por dia no alto rio Uruguai (HAHN *et al.*, 2011).

Schütz *et al.* (2008) identificaram padrões de descolamento do dourado no alto rio Uruguai através de estudos de telemetria. A distribuição dos peixes ao longo do rio, obtida pelos monitoramentos aéreo e fluvial, demonstrou que os dourados utilizam, preferencialmente, quatro áreas longitudinais, localizadas entre o Parque Estadual do Turvo e

a barragem da Usina Hidrelétrica de Itá. De acordo esses autores, em períodos de baixa vazão de fluxo de água do rio os peixes permaneciam estacionados junto à saída da água turbinada da Usina Hidrelétrica (UHE) Itá, ou desciam o rio em busca de locais mais protegidos, como o Parque Estadual do Turvo. No período de reprodução, a maior concentração de dourados foi registrada imediatamente a jusante da UHE Itá, uma vez que os peixes não têm como transpor a barragem da usina supracitada e se acumulam nesse local, quando pode ser observada uma grande concentração de peixes (SCHÜTZ *et al.*, 2008).

Estudos realizados com o dourado no rio Mogi-Guaçu, bacia do alto rio Paraná, indicam que a desova ocorre entre novembro e janeiro, com pico em dezembro (BARBIERI *et al.*, 2000). Considerando a região do alto rio Uruguai, o período reprodutivo de *S. brasiliensis* ocorre na primavera e no verão, com picos entre os meses de dezembro e fevereiro, período associado com os maiores valores de vazão da água, precipitação e temperatura (MACHADO, 2003; REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2008). A maior frequência de indivíduos maduros, tanto para fêmeas quanto para machos de *S. brasiliensis* ocorre entre meses de outubro e fevereiro (MACHADO, 2003). Segundo Machado (2003), o início do aumento da relação gonadossomática no mês de outubro, e o maior número de indivíduos desovados/esgotados após o mês de fevereiro (Figuras 1.2 e 1.3). A ocorrência de ovos e larvas de *S. brasiliensis* confirma o período de reprodução para a bacia do rio Uruguai, entre os meses de novembro a janeiro (HERMES-SILVA, 2003; REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2008).

Devido às características topográficas distintas da bacia do alto rio Uruguai, a desova de *S. brasiliensis* ocorre nos tributários, que é uma região com maior fluxo de água e conseqüentemente maior oxigenação, sendo assim, favorável para a eclosão e o desenvolvimento inicial das larvas (ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003).

**Figura 1.2.** Valores médios da distribuição sazonal das frequências de ocorrência do estágio de maturação gonadal (EMG) e relação gonadossomática (RGS) para fêmeas de *S. brasiliensis* da região do alto rio Uruguai, entre os anos de 1987 e 2002.

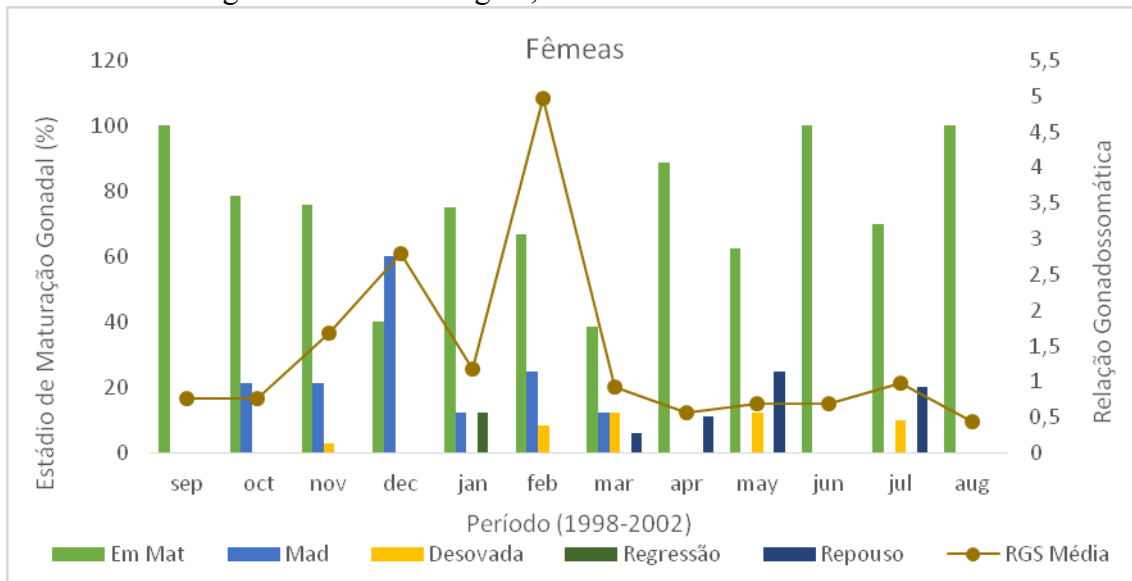


Gráfico modificado de Machado (2003).

**Figura 1.3.** Valores médios da distribuição sazonal das frequências de ocorrência do estágio de maturação gonadal (EMG) e relação gonadossomática (RGS) para machos de *S. brasiliensis* da região do alto rio Uruguai, entre os anos de 1998 e 2002.

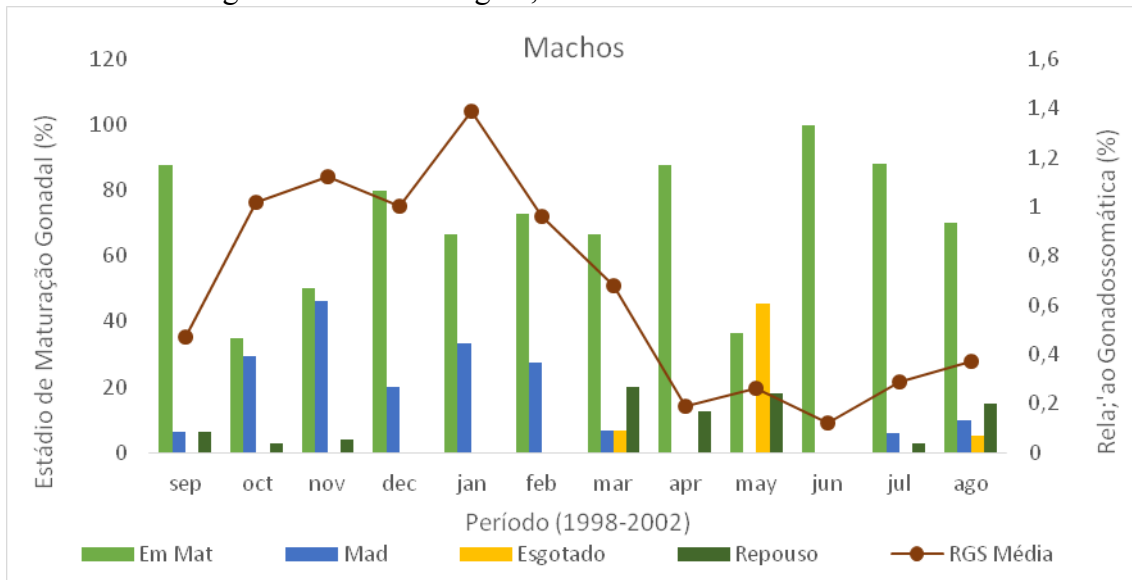


Gráfico modificado de Machado (2003).

### 1.3 HIPÓTESES

Esta tese tem as seguintes hipóteses:

a. No período reprodutivo diversos cardumes *S. brasiliensis* se reproduzem em diferentes momentos, levando a um mecanismo de isolamento temporal chamado de isolamento por tempo, responsável pela manutenção das populações genéticas distintas;

b. Durante o período não-reprodutivo as populações que segregam durante o período reprodutivo se encontram homogeneizadas, não sendo possível, portanto, detectar estruturação genética para *S. brasiliensis* no período caracterizado como de alimentação.

c. Ocorre redução da variação genética de *S. brasiliensis* a montante do barramento. Os peixes localizados acima da UHE Itá, que segundo dados de biologia pesqueira estão em declínio acentuado, apresentam diversidade genética menor que os peixes localizados a jusante da usina. Adicionalmente, a existência dos barramentos pode reduzir a variabilidade genética das populações de *S. brasiliensis* que estão situadas entre compartimentos formados pelas usinas hidrelétricas instaladas na bacia do alto rio Uruguai, onde o recrutamento ainda existe.

d. Devido às características agregarias durante a reprodução, fecundação externa e ausência de cuidado parental, testamos a hipótese de poligamia durante a desova e fertilização de *S. brasiliensis* em ambiente natural.

## 1.4. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de ações de conservação biológica e do conhecimento sobre a estrutura genética de peixes migradores Neotropicais, a presente tese teve os seguintes objetivos:

### 1.4.1 OBJETIVO GERAL

Inferir sobre o sistema de acasalamento e sobre os parâmetros genético populacionais de *S. brasiliensis* da bacia do alto e médio rio Uruguai.

### 1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Estimar a diversidade genética do dourado, *S. brasiliensis* provenientes de diferentes pontos amostrais na bacia do alto e médio rio Uruguai, com base em marcadores moleculares de tipo microssatélites;

b. Determinar a existência de estruturação populacional de *S. brasiliensis* amostrados espacial e temporalmente na bacia do alto e médio rio Uruguai;

c. Verificar se ocorre redução da diversidade genética de *S. brasiliensis* a montante e a jusante do barramento da UHE Itá;

d. Estimar o grau de parentesco genético entre larvas de *S. brasiliensis* amostradas de uma desova ocorrida em ambiente natural, na bacia alto rio Uruguai;

e. Inferir sobre o sistema de acasalamento de *S. brasiliensis* a partir das categorias de relacionamento encontradas para as larvas obtidas de desova natural observada na bacia do alto rio Uruguai.

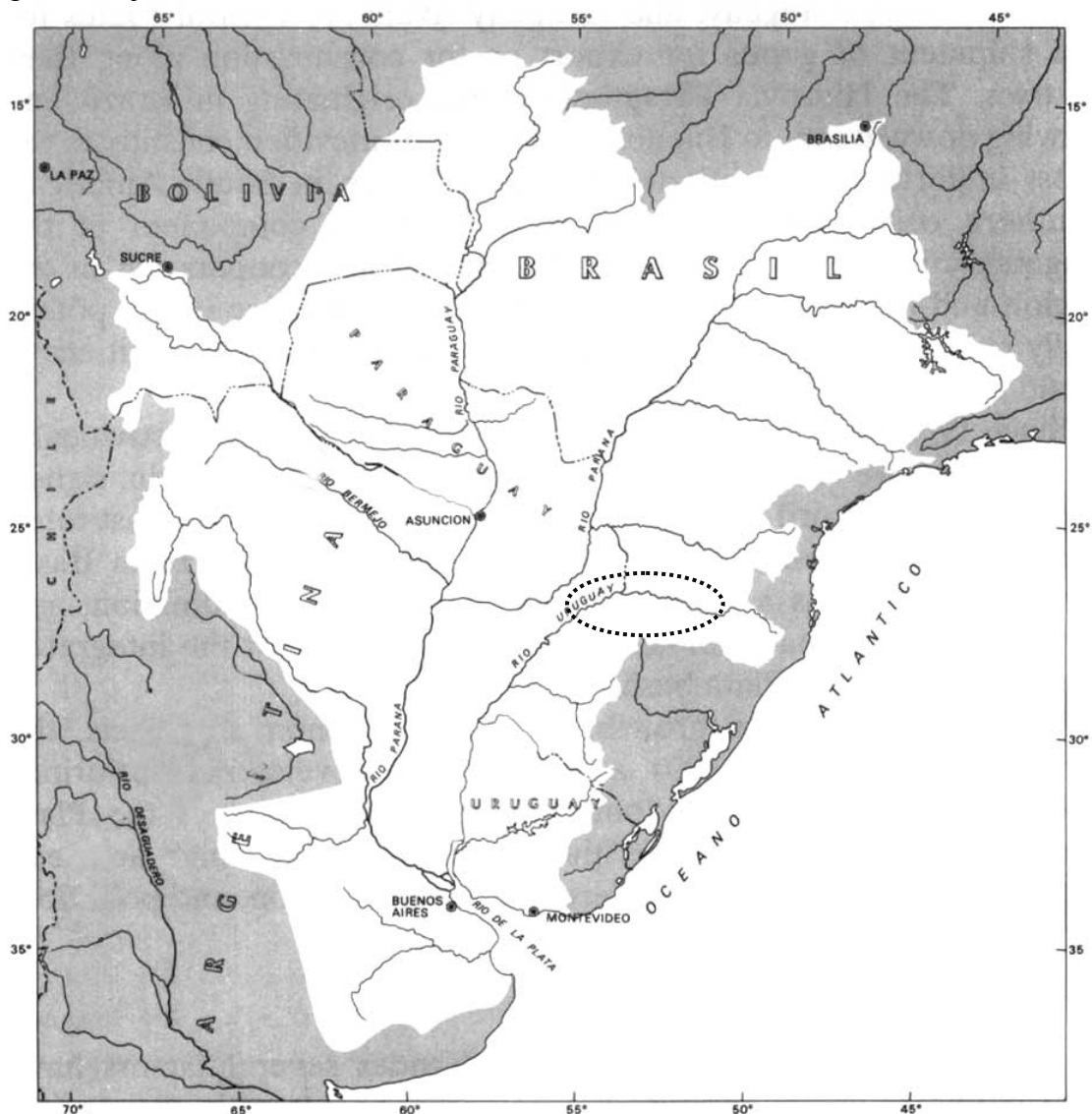


## 1.5 ÁREA DE ESTUDO

### A BACIA DO RIO URUGUAI

O rio Uruguai, juntamente com os rios Paraná e Paraguai, formam a bacia hidrográfica do Prata, que é a segunda maior do planeta (área aproximada de 3,1 milhões de km<sup>2</sup>; OEA, 1969) (Figura 1.4).

**Figura 1.4.** Mapa de localização da bacia do Prata. A área de estudo está demarcada pela figura tracejada.



Fonte: Modificado de [www.nzdl.org](http://www.nzdl.org)

O rio Uruguai possui 2.200 quilômetros de extensão e se origina da confluência dos rios Pelotas e Canoas, assumindo direção Leste-Oeste, dividindo os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (ANA, 2013). Depois segue em direção ao Sul do continente, fazendo fronteira entre a Argentina e o Brasil. A região brasileira da bacia hidrográfica do Uruguai é

dividida em 13 unidades, sendo que quatro delas ficam no estado de Santa Catarina e nove no estado do Rio Grande do Sul. Cerca de 3,9 milhões de pessoas vivem na parte brasileira da região hidrográfica do Uruguai, com maior concentração nas unidades hidrográficas de Chapecó, Canoas, Ibicuí e Turvo (ANA, 2013).

Situado em um vale subtropical, o rio Uruguai é o mais jovem da bacia do Prata (OEA, 1969) e repousa sobre rochas sedimentares e vulcânicas (SOLDANO, 1947). As seções correspondentes ao alto e médio rio Uruguai ocupam um vale bastante íngreme com a presença de uma pequena planície, mas o que predomina é um leito profundamente canalizado, dividido por cachoeiras e corredeiras, com poucas ilhas ou campos alagados (ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003). Na região superior, um trecho do rio se destacava por sua beleza e particularidade. Conhecido como Estreito de Augusto César Gorge, o local se tratava de uma fenda natural de rochas, que comprimia o rio, que normalmente apresentava mais de 400 metros de largura, em um corredor de rochas de menos de 20 metros. Nos períodos de seca o nível da água reduzia e a fenda chegava a ter 1 metro de largura em determinado ponto, que era conhecido popularmente como “passo-da-formiga” (Figura 1.5). Com a construção da UHE Itá, situada a jusante desse obstáculo, a região foi submersa pelo reservatório formado pela barragem, cujo início da operação ocorreu em 2000.

A região do presente estudo também apresenta outro obstáculo natural destacado, conhecido como Salto Yucumã ou Grande Salto Moconá, situado após a confluência do rio Uruguai com o rio Peperiguaçu. O Salto Yucumã é formado por uma queda de 12 metros que se forma através de uma fenda diagonal com cerca de 1.800m de extensão. Essa fenda separa o trecho do alto e do médio rio Uruguai, situado no Parque Estadual do Turvo (ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003) (Figura 1.6).

O período de cheias na região Sul do Brasil é menos evidente do que para a maioria das bacias hidrográficas brasileiras, caracterizado por rápidos pulsos de enchente em algumas épocas do ano. Por estar nessa região, o rio Uruguai apresenta algumas peculiaridades (como período de chuvas diferenciado) em relação as demais bacias hidrográficas brasileiras. A temporada que caracteriza o final do inverno e o início da primavera apresenta os maiores valores de precipitação, enquanto que os meses de verão e início de outono são os mais secos (SARTORI, 2003). Na região do baixo rio Uruguai a variação média mensal do nível da água é menor que dois metros entre os períodos de seca e de chuvas, já na parte superior e média as variações podem chegar a 10 metros. Devido a este padrão geográfico e hidrológico, as

espécies migradoras, que são também as espécies de maior porte, ficam restritas ao rio principal e ou a seção inferior dos tributários.

**Figura 1.5.** Imagens do Estreito Augusto César Gorge antes do enchimento do reservatório da usina hidrelétrica de Itá (esquerda), e após a formação do reservatório (direita).



Fonte: portaldemarcelino.com.br

**Figura 1.6.** Imagem aérea do Salto Yucumã, divisa do Brasil com a Argentina.

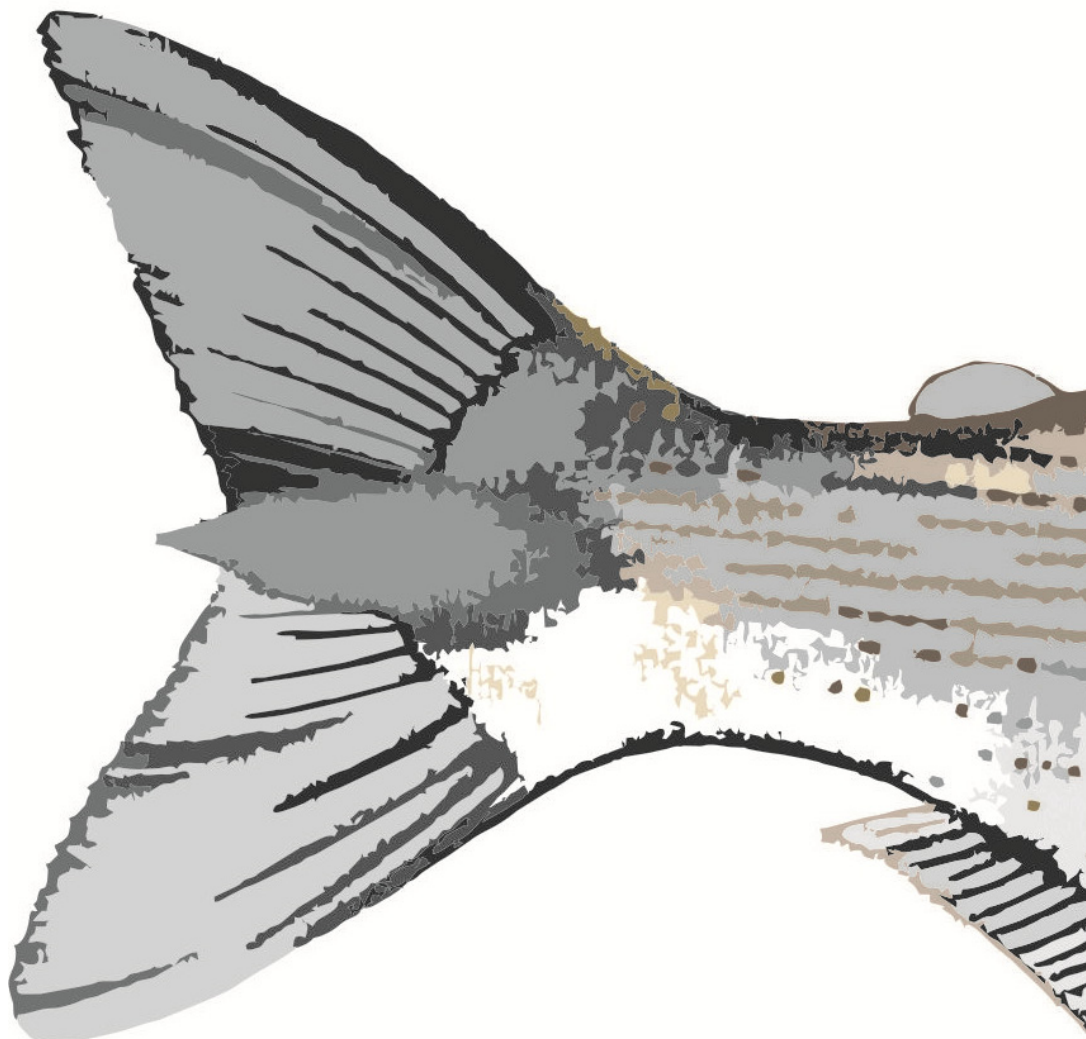


Fonte: www. recorramisiones.com.ar

No trecho superior do rio, chamado de alto rio Uruguai, existem atualmente três barragens construídas no seu leito principal: UHE Itá (1.450 MW); UHE Machadinho (1.140 MW) que iniciou suas atividades em 2002; UHE Foz do Chapecó (855 MW), que entrou em operação no ano de 2010; e uma barragem no rio Pelotas: UHE Barra Grande (690 MW), que entrou em operação em 2005. Até o presente momento, nenhuma das usinas hidrelétricas localizadas na região do alto e médio rio Uruguai possuem sistema de transposição ou de passagem de peixes, como eclusas ou escadas.

A área de estudo do presente trabalho está localizada na porção do alto e médio rio Uruguai. As amostragens do Capítulo 2 e Capítulo 3 foram realizadas a jusante da UHE Itá e próximo à foz do rio Peperiguaçu, ambos localizados na região do alto rio Uruguai, e próximo à foz do rio Turvo, no trecho do médio rio Uruguai. A área de coleta do Capítulo 4 e Capítulo 5 localiza-se apenas na região do alto rio Uruguai.

**ISOLAMENTO POR TEMPO (IBT) EM  
POPULAÇÕES DE DOURADO  
(*Salminus brasiliensis*) NA BACIA DO ALTO  
E MÉDIO RIO URUGUAI**



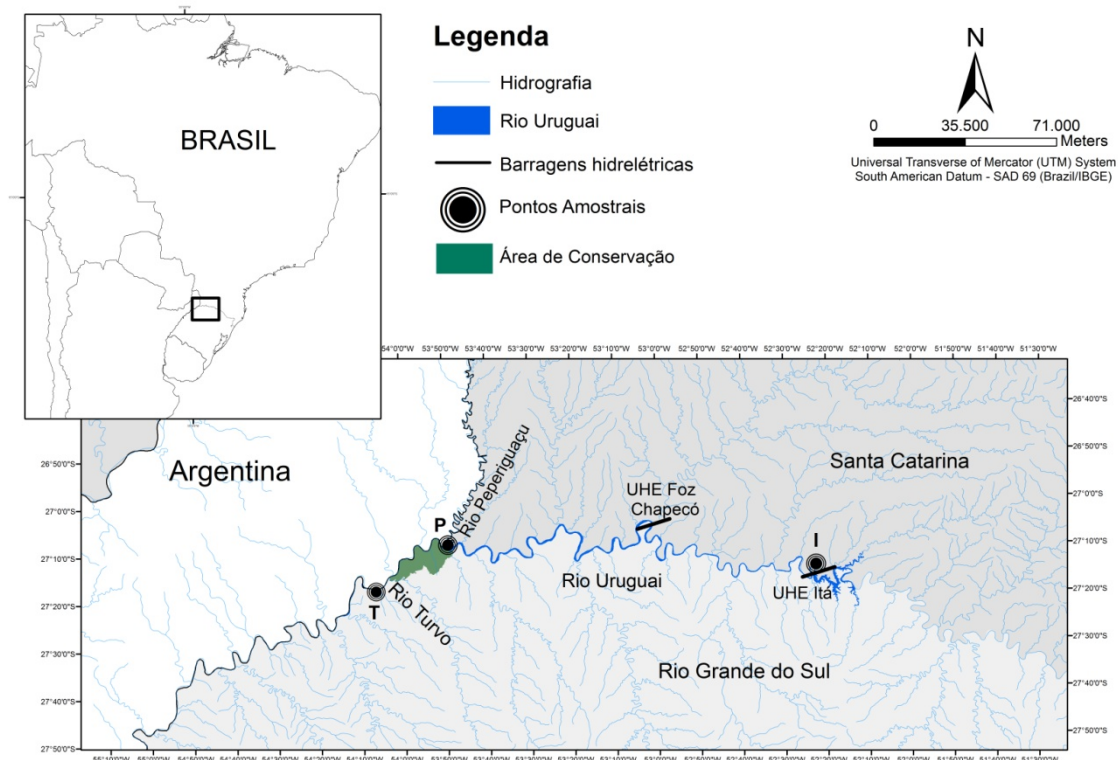
## 2. Isolamento por tempo (IBT) em populações de dourado (*Salminus brasiliensis*) na bacia do alto e médio rio Uruguai

### 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1.1 Amostragem

Foram analisados 418 exemplares de *S. brasiliensis* amostrados na bacia do alto e médio rio Uruguai. A amostragem foi realizada com o objetivo de investigar diferenças de isolamento por tempo (dentro de uma mesma estação de desova), diferenças temporais (entre estações de desova) e diferenças de isolamento por distância (entre diferentes pontos de amostragem). Foram amostrados dois períodos reprodutivos PR/2010-2011 (outubro de 2010 a fevereiro de 2011) e PR/2011-2012 (outubro de 2011 a fevereiro de 2012), em três pontos amostrais distintos: I - a jusante da UHE de Itá, no município de Itá (SC); P- próximo à foz do rio Peperiguaçu, localizado no município de Itapiranga (SC) e T - na foz do rio Turvo, no município de Esperança do Sul (RS) (Figura 2.1).

**Figura 2.1.** Locais de coleta de *S. brasiliensis* na bacia do alto e médio rio Uruguai, Brasil. Mapa obtido a partir da base temática do LAPAD-UFSC. I: Jusante da UHE Itá; P: Foz do rio Peperiguaçu e T: Foz do rio Turvo.



Fonte: LAPAD/UFSC.

A coleta das amostras foi realizada com auxílio do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixe de Água Doce (LAPAD), da Universidade Federal de Santa Catarina, e de pescadores ribeirinhos locais. Os peixes foram capturados através de molinete e de espinhéis. Após a retirada de um pequeno fragmento da nadadeira caudal (aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>), os peixes foram devolvidos ao rio. Todas as amostras de tecido foram imediatamente preservadas em álcool absoluto e posteriormente armazenadas em freezer (-20°C). Detalhes do número amostral de cada ponto e período de coleta podem ser visualizados na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Amostras de *S. brasiliensis* utilizados no presente estudo. Ponto amostral a jusante UHE Itá (I) (divisa dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil), e os pontos amostrais na Foz do rio Peperiguaçu (P) e na Foz do rio Turvo (T) (divisa entre o Brasil e a Argentina). N= número de indivíduos.

Local	Coordenada Geográfica	Período da amostragem	Código	N
<b>Primeiro Período Reprodutivo</b>				
Jusante UHE Itá (I)	27°17'32'' S 52°23'42'' W	Outubro-2010	I-Out/10	24
		Novembro-2010	I-Nov/10	20
		Dezembro-2010	I-Dez/10	27
		Janeiro-2011	I-Jan/11	28
		Fevereiro-2011	I-Fev/11	27
Foz do rio Peperiguaçu (P)	27°10'03.81'' S 53°50'07'' W	Outubro-2010	P-Out/10	24
		Novembro-2010	P-Nov/10	08
		Dezembro-2010	P-Dez/10	21
		Janeiro-2011	P-Jan/11	14
		Fevereiro-2011	P-Fev/11	20
Foz do rio Turvo (T)	27°15'50.16'' S 54°03'16.97'' W	Outubro-2010	T-Out/10	26
		Dezembro-2010	T-Dez/10	18
		Janeiro-2011	T-Jan/11	30
		Fevereiro-2011	T-Fev/11	34
<b>Segundo Período Reprodutivo</b>				
Foz do rio Turvo (T)	27°15'50.16'' S 54°03'16.97'' W	Outubro-2011	T-Out/11	29
		Dezembro-2011	T-Dez/11	30
		Janeiro-2012	T-Jan/12	20
		Fevereiro-2012	T-Fev/12	18

### 2.1.2 Extração do DNA e amplificação dos locos de microssatélites

O DNA genômico dos indivíduos foi extraído a partir de um fragmento de nadadeira utilizando-se o procedimento de Aljanabi e Martinez (1997) (detalhes no Anexo 1). A integridade do DNA obtido foi avaliada mediante eletroforese em gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e a concentração do DNA foi obtida em

biofotômetro. O DNA de trabalho foi diluído em água Milli-Q a uma concentração de aproximadamente 30ng/μl.

Foram utilizados 11 iniciadores de oligonucleótidos (*primers*) heterólogos de microssatélites para caracterizar as populações amostrais, selecionados com base na literatura (Anexo 2). Desses, nove *primers* foram desenvolvidos para *Salminus franciscanus*: Sfra02, Sfra10, Sfra13, Sfra03, Sfra04, Sfra18, Sfra14, Sfra05, Sfra15 (ROSSINI *et al.*, 2010); um para *Salminus hilarii*: Sh56 (SILVA; HILSDORF, 2011) e um para *Brycon opalinus*: BoM2 (BARROSO *et al.*, 2003). Todos os *primers* utilizados foram sintetizados com a adição de uma cauda de 18pb, conhecida como sequencia universal (TGT AAA ACG ACG GCC AGT), na extremidade 5' de um dos *primers* (*forward* ou *reverse*), segundo protocolo desenvolvido por Schuelke (2000). Esta cauda serve como sítio de hibridização para um iniciador universal conhecido como *primer* M13, que é marcado com fluorescência. O objetivo do uso desse *primer* universal é a redução de custos com a marcação fluorescente de *primers* específicos. Desta maneira, na mesma reação de amplificação são utilizados dois *primers* específicos (sendo um deles com a adição da cauda de 18 pb na porção 5') e um terceiro *primer* (M13) marcado com fluorescência.

As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 10μl contendo 30ng de DNA molde, 1X de *GoTaq® Colorless Master Mix 2X* (Promega), 8pmol do iniciador M13 com fluorescência (FAM, TET ou HEX), 8pmol do iniciador *forward*; 2pmol do iniciador *reverse* (com a sequência da cauda M13). Os programas de amplificação seguiram o seguinte padrão: 5 minutos a 94°C seguidos por 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos na temperatura de anelamento (ROSSINI *et al.*, 2010; BARROSO *et al.*, 2003; SILVA; HILSDORF, 2011), 45 segundos a 72°C; 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C; e um ciclo final de 10 minutos a 72°C. As genotipagens foram realizadas em sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare Life Science) e a leitura dos alelos foi realizada através do programa *Fragment Profiler Software Suite v1.2* (GE Healthcare Life Science) com ET-ROX 550-R como tamanho padrão.

### 2.1.3 Estimativa dos níveis de diversidade genética e estruturação populacional

A presença de alelos nulos foi verificada através do programa MICROCHECKER (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). O número de alelos (*A*) e os valores da



heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) foram estimados através do programa GENALEX 6.5 (PEAKALL, SMOUSE, 2012). A estimativa da riqueza alélica ( $R_a$ ) e o índice de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), juntamente com os valores de  $p$  para o excesso e para o déficit de heterozigotos, foram calculados no programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001). Testes para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $EHW$ ), realizados usando o método baseado em Cadeias de Markov (GUO; THOMPSON, 1992), e testes de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos foram realizados através do programa GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Correções para testes múltiplos foram feitas seguindo o procedimento de Bonferroni ( $k$ ) (RICE, 1989).

Inicialmente o programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000; FALUSH *et al.*, 2003) foi utilizado para determinar a estruturação genética populacional. Ele utiliza a técnica de *clustres* bayesianos, juntamente com o algoritmo Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) para detectar o número de grupos geneticamente homogêneos ( $K$ ). As análises para determinar o número de populações foram realizadas sem informação *a priori* da origem dos indivíduos. A maioria dos parâmetros foi configurada de acordo com os seus valores *default*, sugerido pelos autores do programa. Escolheu-se o modelo de mistura das populações, com a opção de frequências alélicas correlacionadas, pois é adequada em casos onde a estruturação esperada é leve (FALUSH *et al.*, 2003; EVANNO *et al.*, 2005). Para cada valor de  $K$  (1 a 10) foram realizadas seis corridas independentes, e para cada uma delas foram realizadas 1.000.000 cadeias de Markov-Monte Carlo, após um período de corte inicial (*burn-in*) de 200.000 interações. O logaritmo da probabilidade dos dados  $\ln P(D/K)$  (PRITCHARD *et al.*, 2000) e as estimativas de DeltaK (EVANNO *et al.*, 2005) foram determinadas através do programa Structure Harvester (EARL, 2012).

Os valores de  $F_{ST}$  (WEIR; COCKERHAM, 1984), para combinações par-a-par, foram obtidos através do programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005). As correções para testes múltiplos foram feitas seguindo o procedimento Bonferroni ( $k$ ) (RICE, 1989). Estimativas de diferenciação genética de Jost ( $D_{est}$ ), realizada entre pares de populações amostrais, foram obtidas através do programa SMOGD v1.2.5 (CRAWFORD, 2010), com 1.000 réplicas de *bootstrap*. As análises da variância molecular (AMOVA) foram realizadas no programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005) para verificar a partição da variância entre e dentro das populações. A análise de correspondência multidimensional fatorial (FCA) foi obtida através do programa

GENETIX 4.02 (BELKHIR *et al.*,2004), que permite a visualização dos indivíduos no espaço, pela projeção dos resultados de similaridade de seus alelos.

Informações sobre os parâmetros ambientais foram obtidas a partir da estação climatológica 83881, que está localizada no município de Iraí-RS. Esta estação foi escolhida por ser a mais próxima da região de estudo. Os dados foram obtidos no Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa, do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

## 2.2 RESULTADOS

### 2.2.1 *Diversidade genética e estrutura populacional*

Os parâmetros genéticos populacionais para as 18 populações amostrais e os 11 locos de microssatélites utilizados podem ser visualizados na Tabela 2.2. O programa MICROCHECKER detectou evidência significativa de déficit de heterozigotos para os locos Sfra05, Sfra10 e Sfra18 em uma população amostral para cada loco (T-Fev/12, I-Jan/11 e P-Dez/10, respectivamente). Os locos Sfra02 e Sfra15 apresentaram déficit de heterozigotos em diversas populações amostrais, sugerindo indícios da presença de alelos nulos e, portanto, excluídos das análises de estruturação genética. Foram detectados desvios significativos do EHW em locos de seis populações amostrais (I-Dez/10; T-Dez/10; T-Jan/11; T-Out/11; T-Dez/11; T-Jan/12). Valores significativos de  $F_{IS}$  foram detectados em cinco populações amostrais: I-Out/10 (loco Sfra05); I-Jan/11 (Sfra02); T-Dez/10 (Sfra10); T-Jan/11 (Sfra10); T-Dez/11 (Sfra04). Para a maioria das situações a presença de alelos nulos pode explicar o excesso de homozigotos que foram detectados pelos valores significativos de  $F_{IS}$ . O número de alelos variou de três (I-Fev/11; loco BoM2) a 31 (T-Dez/11; loco Sfra02). As populações amostrais apresentaram  $H_e$  média de 0,825 e  $H_o$  média de 0,851. O número de alelos privados variou de um a 11, com maiores valores para as populações amostrais I-Out/10 e T-Jan/11, porém com baixas frequências identificadas em cada uma delas. Os maiores valores de frequência de alelos privados foram encontrados para as populações amostrais I-Fev/11 (loco Sfra15) e I-Out/10 (loco Sh56), com valores de 12,5 e 7,5% respectivamente.

**Tabela 2.2.** Parâmetros de variação genética nas populações amostrais de *S. brasiliensis* baseados em 11 locos de microssatélites. Para cada loco apresentam-se: o número de indivíduos analisados ( $N$ ), o número de alelos ( $A$ ), a riqueza alélica ( $Ra$ ), a heterozigosidade observada ( $Ho$ ) e esperada ( $He$ ), o coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Valores de  $p$  significativos para o desvio EHW estão em negrito; valores significativos para  $F_{IS}$  se apresentam com asterisco, e valores com déficit de heterozigotos estão em itálico. Valores de após correção de Bonferroni ( $p=0,0003$ ).

	Locos de microssatélites										
	Sfra02	Sfra10	Sfra13	Sfra03	Sfra04	Sfra18	Sfra05	Sfra14	Sfra15	BoM2	Sh56
<b>I-Out/10</b>											
$N$	21	22	21	24	24	23	22	21	20	23	20
$A$	21	9	17	11	10	5	10	17	16	8	16
$Ra$	8,200	5,240	7,740	5,610	5,330	3,360	5,710	7,430	6,910	4,980	7,230
$Ho$	0,905	0,864	1,000	0,958	0,667	0,522	0,545	0,857	0,700	0,826	0,850
$He$	0,931	0,811	0,917	0,820	0,798	0,556	0,829	0,905	0,866	0,801	0,896
$F_{IS}$	0,052	-0,042	-0,066	-0,148	0,185	0,083	0,362*	0,077	0,216	-0,010	0,077
$P_{EHW}$	0,212	0,159	0,796	0,262	0,023	0,325	0,059	0,104	0,003	0,314	0,112
<b>I-Nov/10</b>											
$N$	24	24	24	24	24	24	24	24	24	22	21
$A$	24	12	18	16	11	8	13	18	20	9	8
$Ra$	8,520	5,550	7,650	6,870	5,500	4,230	6,770	7,230	7,420	4,910	4,960
$Ho$	1,000	0,792	0,958	0,792	0,750	0,667	0,792	0,833	0,792	0,818	0,952
$He$	0,944	0,825	0,918	0,883	0,806	0,644	0,889	0,900	0,897	0,767	0,797
$F_{IS}$	-0,039	0,061	-0,023	0,124	0,090	-0,014	0,130	0,095	0,138	-0,044	-0,171
$P_{EHW}$	0,061	0,260	0,123	0,011	0,021	0,085	0,028	0,292	0,030	0,036	0,177
<b>I-Dez/10</b>											
$N$	24	26	26	26	22	24	26	24	22	25	25
$A$	24	7	22	14	7	6	9	16	20	8	7
$Ra$	8,300	4,920	8,060	6,510	4,990	3,530	5,960	7,400	8,060	4,690	4,630
$Ho$	0,875	0,923	0,962	0,769	0,682	0,458	0,731	0,958	0,727	0,880	0,960
$He$	0,934	0,801	0,931	0,873	0,786	0,568	0,859	0,910	0,927	0,763	0,786
$F_{IS}$	0,084	-0,133	-0,013	0,138	0,155	0,213	0,169	-0,032	0,237	-0,133	-0,203
$P_{EHW}$	0,002	0,283	0,549	0,026	0,006	0,121	0,019	0,198	<b>0,0000</b>	0,521	0,095

<b>I-Jan/11</b>											
<i>N</i>	20	20	20	20	20	20	20	19	20	20	20
<i>A</i>	19	9	22	12	7	6	12	17	22	8	7
<i>Ra</i>	7,890	4,840	8,540	5,710	4,840	4,020	5,820	7,630	8,450	4,590	4,610
<i>Ho</i>	0,700	0,600	1,000	0,900	0,800	0,700	0,750	1,000	0,900	0,800	0,750
<i>He</i>	0,920	0,781	0,940	0,810	0,780	0,661	0,838	0,911	0,938	0,745	0,763
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,263*	0,256	-0,038	-0,086	0,000	-0,033	0,130	-0,070	0,066	-0,048	0,042
<i>P<sub>EHW</sub></i>	0,001	0,009	0,701	0,729	0,157	0,976	0,175	0,950	0,111	0,566	0,015
<b>I-Fev/11</b>											
<i>N</i>	8	8	8	8	8	8	7	8	8	6	6
<i>A</i>	11	6	11	10	6	6	6	11	13	3	4
<i>Ra</i>	8,130	4,830	7,960	7,210	4,630	4,710	5,120	8,130	8,880	2,820	3,820
<i>Ho</i>	0,750	1,000	1,000	1,000	0,500	0,625	0,571	1,000	0,625	0,333	1,000
<i>He</i>	0,898	0,750	0,891	0,859	0,641	0,688	0,765	0,898	0,914	0,403	0,653
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,229	-0,273	-0,057	-0,098	0,282	0,157	0,324	-0,047	0,375	0,259	-0,463
<i>P<sub>EHW</sub></i>	0,073	0,745	1,000	0,714	0,213	0,114	0,089	0,379	0,0003	0,272	0,480
<b>P-Out/10</b>											
<i>N</i>	26	26	27	27	27	27	27	26	27	26	26
<i>A</i>	27	8	20	16	8	10	13	17	25	8	7
<i>Ra</i>	8,720	4,530	8,270	5,840	4,710	5,170	5,950	7,250	8,460	5,230	5,210
<i>Ho</i>	0,846	0,769	0,963	0,852	0,889	0,704	0,778	0,962	1,000	0,885	1,000
<i>He</i>	0,950	0,751	0,940	0,815	0,765	0,774	0,845	0,901	0,944	0,808	0,814
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,129	-0,005	-0,006	-0,027	-0,143	0,109	0,098	-0,048	-0,041	-0,075	-0,210
<i>P<sub>EHW</sub></i>	0,002	0,355	0,737	0,918	0,147	0,001	0,033	0,647	1,000	0,789	0,164
<b>P-Nov/10</b>											
<i>N</i>	21	21	21	21	21	21	19	21	20	21	20
<i>A</i>	20	9	16	9	9	7	9	17	19	6	8
<i>Ra</i>	8,360	4,810	7,410	4,980	4,800	4,470	4,910	7,540	8,160	4,590	4,870
<i>Ho</i>	0,810	0,857	0,952	0,810	0,857	0,714	0,632	0,857	0,950	0,810	0,900
<i>He</i>	0,937	0,762	0,907	0,771	0,765	0,711	0,741	0,912	0,930	0,771	0,771
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,159	-0,101	-0,026	-0,026	-0,096	0,020	0,174	0,084	0,004	-0,026	-0,142
<i>P<sub>EHW</sub></i>	0,004	0,273	0,672	0,907	0,114	0,653	0,066	0,051	0,247	0,109	0,429

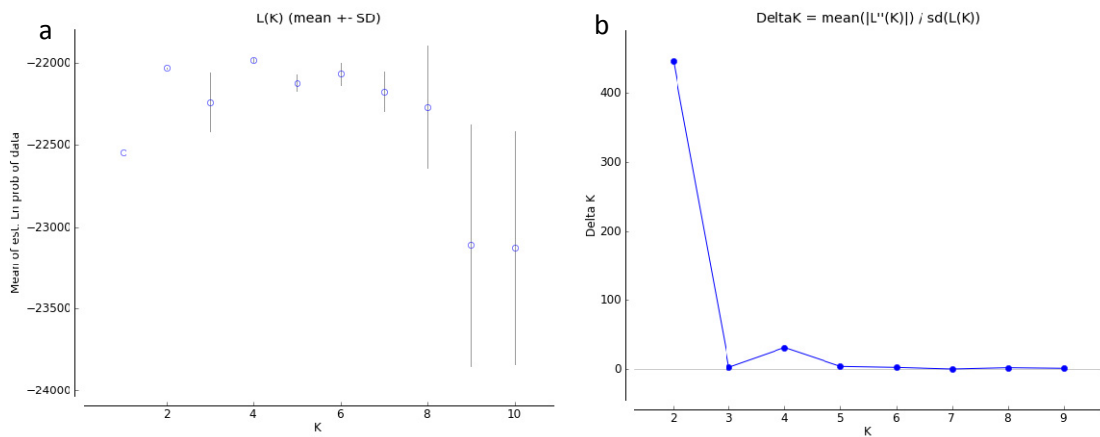
<b>P-Dez/10</b>											
<i>N</i>	15	14	8	12	14	11	12	14	10	12	10
<i>A</i>	24	8	11	10	9	7	7	16	17	6	5
<i>Ra</i>	9,180	5,360	7,500	6,060	6,340	4,980	5,220	8,240	9,160	4,150	4,370
<i>Ho</i>	0,867	0,857	0,875	0,833	0,857	0,455	0,583	0,929	1,000	0,750	0,700
<i>He</i>	0,947	0,801	0,852	0,823	0,865	0,731	0,802	0,923	0,930	0,670	0,755
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,119	-0,033	0,039	0,031	0,046	0,419	0,313	0,032	-0,023	-0,076	0,125
<i>P<sub>EHW</sub></i>	0,037	0,691	0,700	0,410	0,206	0,004	0,033	0,039	1,000	0,492	0,592
<b>P-Jan/11</b>											
<i>N</i>	28	28	27	28	26	28	28	23	27	27	27
<i>A</i>	24	10	24	15	5	5	9	21	26	7	8
<i>Ra</i>	8,320	5,520	8,110	6,090	3,700	3,620	5,240	8,330	8,200	4,630	5,350
<i>Ho</i>	0,929	0,750	0,926	0,964	0,885	0,500	0,893	1,000	0,926	0,889	0,889
<i>He</i>	0,941	0,821	0,931	0,849	0,685	0,573	0,797	0,938	0,933	0,748	0,830
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,031	0,104	0,024	-0,118	-0,274	0,146	-0,103	-0,044	0,026	-0,171	-0,052
<i>P<sub>EHW</sub></i>	0,424	0,044	0,812	0,336	0,165	0,216	0,142	0,549	0,206	0,827	0,088
<b>P-Fev/11</b>											
<i>N</i>	14	14	14	14	12	14	14	13	14	14	14
<i>A</i>	16	8	18	8	6	6	8	13	18	7	10
<i>Ra</i>	8,270	5,140	8,330	4,860	4,460	4,210	5,160	7,240	8,560	4,270	6,220
<i>Ho</i>	1,000	0,786	1,000	1,000	0,917	0,714	0,929	1,000	0,929	0,929	1,000
<i>He</i>	0,923	0,793	0,921	0,760	0,753	0,724	0,791	0,888	0,931	0,719	0,852
<i>F<sub>IS</sub></i>	-0,046	0,047	-0,049	-0,282	-0,175	0,051	-0,138	-0,087	0,040	-0,257	-0,138
<i>P<sub>EHW</sub></i>	1,000	0,209	0,631	0,139	0,468	0,449	0,739	0,897	0,123	0,713	0,800
<b>T-Out/10</b>											
<i>N</i>	30	29	27	30	30	28	30	28	29	30	30
<i>A</i>	25	14	25	12	8	7	15	20	25	7	9
<i>Ra</i>	8,580	6,240	8,660	5,550	4,320	4,400	5,860	7,730	8,460	4,800	5,350
<i>Ho</i>	0,967	0,655	1,000	0,933	0,833	0,571	0,833	1,000	0,966	0,900	0,933
<i>He</i>	0,949	0,863	0,950	0,826	0,692	0,708	0,816	0,923	0,945	0,795	0,822
<i>F<sub>IS</sub></i>	-0,001	0,258	-0,034	-0,113	-0,188	0,210	-0,005	-0,066	-0,004	-0,115	-0,118

$P_{EHW}$	0,286	0,002	1,000	0,513	0,342	0,030	0,021	0,638	0,701	0,103	0,537
<b>T-Dez/10</b>											
$N$	20	26	25	27	27	20	27	27	27	27	26
$A$	21	13	24	12	7	8	8	18	27	11	9
$Ra$	8,370	6,500	8,620	5,090	5,040	4,270	4,980	7,350	8,230	5,000	4,990
$Ho$	0,950	0,577	0,920	0,852	0,556	0,650	0,704	0,963	0,926	0,704	0,692
$He$	0,935	0,876	0,947	0,766	0,800	0,634	0,806	0,910	0,933	0,759	0,777
$F_{IS}$	0,010	0,359*	0,049	-0,093	0,323	0,000	0,145	-0,039	0,027	0,091	0,128
$P_{EHW}$	0,495	<b>0,000</b>	0,040	0,786	<b>0,000</b>	0,273	0,512	0,393	0,462	0,064	0,162
<b>T-Jan/11</b>											
$N$	17	19	20	20	20	18	19	19	20	20	19
$A$	23	11	18	8	8	8	13	15	23	8	8
$Ra$	9,000	5,960	7,680	4,470	4,570	4,780	7,080	6,840	8,700	4,870	5,140
$Ho$	0,941	0,474	0,900	0,700	0,450	0,722	0,842	1,000	0,950	0,900	0,789
$He$	0,948	0,824	0,911	0,723	0,745	0,759	0,895	0,881	0,945	0,766	0,794
$F_{IS}$	0,038	0,447*	0,038	0,057	0,417	0,077	0,086	-0,109	0,020	-0,150	0,032
$P_{EHW}$	0,437	0,001	0,236	0,374	<b>0,000</b>	0,497	0,228	0,494	0,699	0,025	0,788
<b>T-Fev/11</b>											
$N$	32	33	33	32	31	21	30	31	32	33	30
$A$	27	11	27	12	11	8	12	19	28	10	10
$Ra$	8,470	5,530	8,220	5,070	5,800	4,740	5,550	7,540	8,580	4,990	4,980
$Ho$	0,938	0,909	0,970	0,719	0,742	0,857	0,700	1,000	0,844	0,818	0,900
$He$	0,947	0,824	0,938	0,777	0,843	0,772	0,821	0,917	0,950	0,762	0,771
$F_{IS}$	0,026	-0,088	-0,018	0,091	0,136	-0,086	0,164	-0,074	0,127	-0,059	-0,151
$P_{EHW}$	0,012	0,153	0,498	0,285	0,047	0,658	0,029	0,050	0,001	0,109	0,278
<b>T-Out/11</b>											
$N$	27	28	29	26	26	27	29	26	29	29	26
$A$	29	12	19	13	6	7	11	15	26	8	11
$Ra$	8,670	6,020	7,850	6,390	4,660	4,400	5,700	7,020	7,990	5,360	5,950
$Ho$	0,852	0,750	0,931	0,808	0,615	0,556	0,759	0,923	0,690	0,828	1,000
$He$	0,949	0,851	0,926	0,873	0,765	0,717	0,837	0,897	0,923	0,809	0,851

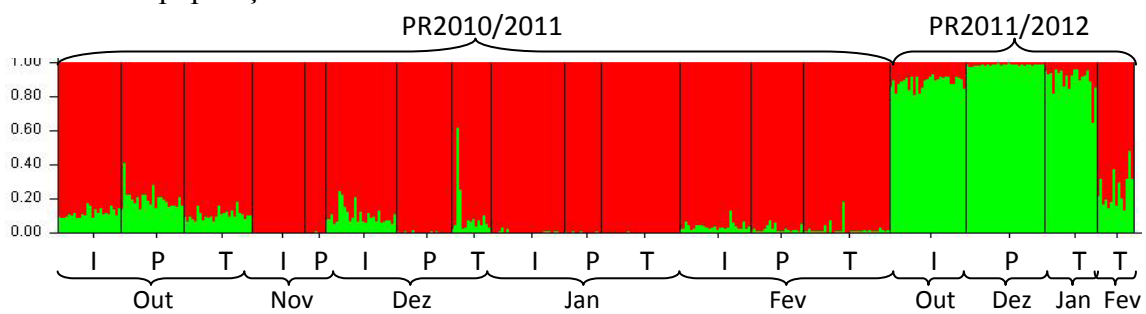
$F_{IS}$	0,121	0,136	0,012	0,094	0,214	0,243	0,111	-0,009	0,269	-0,005	-0,156
$P_{EHW}$	0,036	0,006	0,177	0,064	0,154	0,001	0,002	0,0004	<b>0,000</b>	0,128	0,208
<b>T-Dez/11</b>											
$N$	30	29	26	27	30	27	28	25	29	30	24
$A$	31	10	21	14	8	8	13	14	21	12	12
$Ra$	8,780	4,940	8,100	6,010	4,930	3,830	5,510	6,890	7,580	5,480	6,190
$Ho$	1,000	0,793	0,885	0,963	0,400	0,556	0,750	0,960	0,690	0,867	1,000
$He$	0,954	0,771	0,933	0,839	0,782	0,605	0,816	0,892	0,906	0,819	0,859
$F_{IS}$	-0,031	-0,012	0,071	-0,129	0,501*	0,100	0,099	-0,056	0,255	-0,041	-0,144
$P_{EHW}$	0,045	0,897	0,489	0,528	0,000	0,021	0,019	0,627	<b>0,000</b>	0,150	0,246
<b>T-Jan/12</b>											
$N$	20	20	17	20	20	19	19	20	19	20	19
$A$	22	17	16	11	6	5	9	17	20	7	6
$Ra$	8,270	7,490	7,870	5,540	4,530	3,840	5,830	7,770	8,200	4,430	4,430
$Ho$	1,000	0,950	0,941	0,800	0,600	0,737	0,842	1,000	0,737	0,750	0,895
$He$	0,930	0,909	0,915	0,794	0,730	0,673	0,848	0,916	0,925	0,694	0,767
$F_{IS}$	-0,050	-0,020	0,002	0,018	0,203	-0,068	0,034	-0,066	0,229	-0,056	-0,140
$P_{EHW}$	1,000	0,140	0,518	0,466	0,247	0,838	0,816	0,955	<b>0,0001</b>	0,556	0,692
<b>T-Fev/12</b>											
$N$	11	12	8	9	12	7	7	11	12	10	5
$A$	18	11	11	8	6	4	7	12	11	6	6
$Ra$	9,220	7,090	7,960	5,830	4,670	3,860	5,950	7,400	6,700	4,640	6,000
$Ho$	1,000	0,750	0,750	1,000	0,583	0,571	0,286	1,000	0,750	0,800	0,800
$He$	0,938	0,882	0,891	0,802	0,750	0,663	0,796	0,888	0,837	0,740	0,760
$F_{IS}$	-0,019	0,192	0,222	-0,190	0,263	0,213	0,684	-0,078	0,212	-0,029	0,059
$P_{EHW}$	1,000	0,050	0,006	0,822	0,196	0,328	0,000	0,367	0,009	0,443	0,802

A abordagem Bayesiana, obtida através do programa STRUCTURE, foi utilizada para verificar estruturação genética em ausência de informação, e determinar o número de populações ( $K$ ) a partir das populações amostrais. Os resultados das estimativas de  $L(K)$  e  $\Delta K$  obtidos a partir da análise de todos os indivíduos amostrados revelaram a existência de dois grupos genéticos ( $K=2$ ) (Figura 2.3). Os grupos são basicamente formados por indivíduos amostrados no primeiro (PR/2010-2011) e no segundo período reprodutivo (PR/2011-2012) (Figura 2.4).

**Figura 2.3.** Resultado da análise Bayesiana para a determinação do número de grupos para 418 indivíduos de *S. brasiliensis*, através do logaritmo da probabilidade média dos dados  $L(K)$  (a), e valores de  $\Delta K$  segundo a correção de Evanno *et al.* (2005)(b).



**Figura 2.4.** Probabilidades de atribuição de indivíduos de *S. brasiliensis* para  $K=2$ . As barras coloridas representam as probabilidades de cada indivíduo pertencer ao grupo inferido. Os indivíduos são representados como colunas e as linhas pretas delimitam os grupos amostrados. Números laterais indicam a probabilidade do indivíduo pertencer a determinada população.



*Estruturação Espacial*

A partir do resultado obtido pelo gráfico de probabilidades de atribuição gerado pelo STRUCTURE (Figura 2.4), observamos estruturação temporal e indícios de ausência de variação espacial. No entanto, para verificar essa possibilidade, analisamos a



estrutura populacional entre os indivíduos amostrados espacialmente. As análises espaciais foram realizadas para cada período de coleta a fim de excluir o efeito temporal da análise. Os resultados de  $F_{ST}$  par-a-par não identificaram distância genética significativa entre todas as combinações realizadas (Tabela 2.3). Os resultados de diferenciação genética  $D_{est}$  também foram baixos, com exceção de T-Jan/11, para as análises espaciais. O teste  $D_{est}$  fornece valores em escala quantitativa, variando de 0 a 1, em que 0 é não diferenciado e 1 é totalmente diferenciado. No segundo período reprodutivo todas as amostragens foram realizadas no mesmo ponto amostral, localizado na Foz do rio Turvo, não existindo, portanto, a análise espacial.

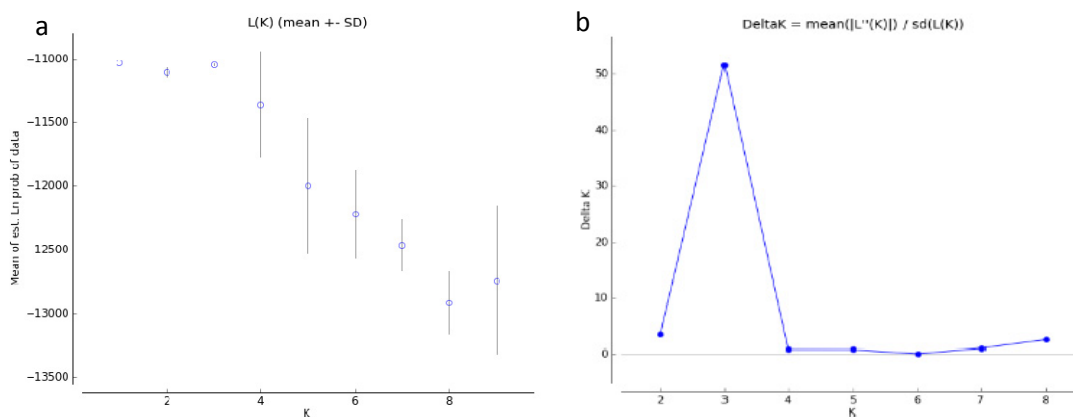
**Tabela 2.3.** Valores de  $F_{ST}$  par-a-par e seus valores de  $p$ , e estimativas de diferenciação genética de Jost ( $D_{est}$ ) para indivíduos de *S. brasiliensis* analisados espacialmente em Out/10, Nov/10, Dez/10, Jan/11 e Fev/11. Valores significativos para  $p < 0,05$  (\*) e após correção de Bonferroni (\*\*).

População	População	$F_{ST}(p)$	$D_{est}$
I-Out/10	P-Out/10	-0,008 (0,561)	0,004
I-Out/10	T-Out/10	-0,007 (0,912)	0,008
P-Out/10	T-Out/10	-0,003 (0,829)	0,006
I-Nov/10	P-Nov/10	-0,010 (0,900)	0,000
I-Dez/10	P-Dez/10	-0,002 (0,528)	0,001
I-Dez/10	T-Dez/10	0,000 (0,337)	0,005
P-Dez/10	T-Dez/10	0,010 (0,064)	0,021
I-Jan/11	P-Jan/11	0,007 (0,086)	0,000
I-Jan/11	T-Jan/11	0,001 (0,309)	0,265
P-Jan/11	T-Jan/11	0,000 (0,354)	0,224
I-Fev/11	P-Fev/11	0,010 (0,066)	0,011
I-Fev/11	T-Fev/11	0,001 (0,407)	0,000
P-Fev/11	T-Fev/11	0,007 (0,081)	0,002

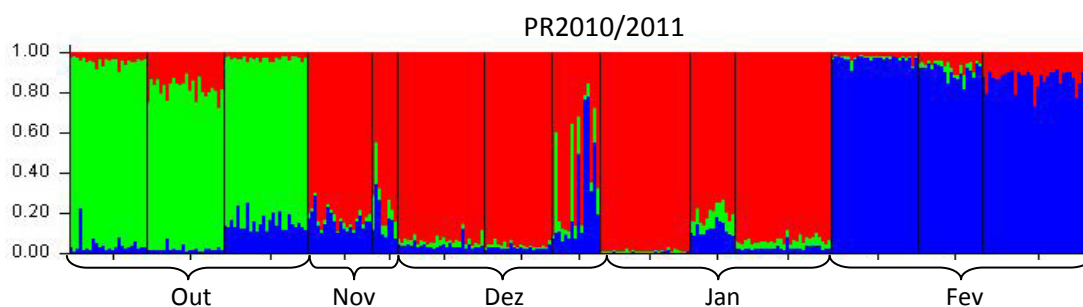
### *Primeiro Período Reprodutivo*

Após a identificação de dois grupos genéticos obtidos a partir da análise Bayesiana (Figura 2.4), avaliamos cada agrupamento individualmente. Foram realizadas novas análises através do programa STRUCTURE e os resultados obtidos das estimativas de  $L(K)$  e  $\Delta K$  revelaram a existência de três grupos genéticos ( $K=3$ ) (Figura 2.5). Os grupos sugeridos pela análise Bayesiana são formados por indivíduos amostrados em Out/10; Nov/10-Dez/10-Jan/11; Fev/12, como mostrado no gráfico de probabilidades (Figura 2.6).

**Figura 2.5.** Resultado da análise Bayesiana para 321 indivíduos de *S. brasiliensis* amostrados no primeiro período reprodutivo (PR/2010-2011). Logaritmo da probabilidade média dos dados L(K) (a) e valores de DeltaK (b), segundo a correção de Evanno *et al.* (2005).



**Figura 2.6.** Gráfico de probabilidades de atribuição de indivíduos de *S. brasiliensis* para  $K=3$ .



Foram realizadas análises de distância genética e diferenciação entre os agrupamentos indicados pela análise Bayesina na Figura 2.6. Apesar de baixos, os valores de  $F_{ST}$  (entre 0,0358 e 0,0538) foram altamente significativos para as três populações amostrais avaliadas (Tabela 2.4). Os valores de  $D_{est}$  calculados apoiam com os resultados de  $F_{ST}$ , indicando baixa diferenciação genética entre as populações (Tabela 2.5).

**Tabela 2.4.** Valores de  $F_{ST}$  par-a-par (abaixo da diagonal) e  $p$  (acima) entre as populações amostrais Out/10; Nov/10-Dez/10-Jan/11; e Fev/11. Valores significativos para  $p < 0,05$  (\*) e após correção de Bonferroni ( $p = 0,0017$ ) (\*\*).

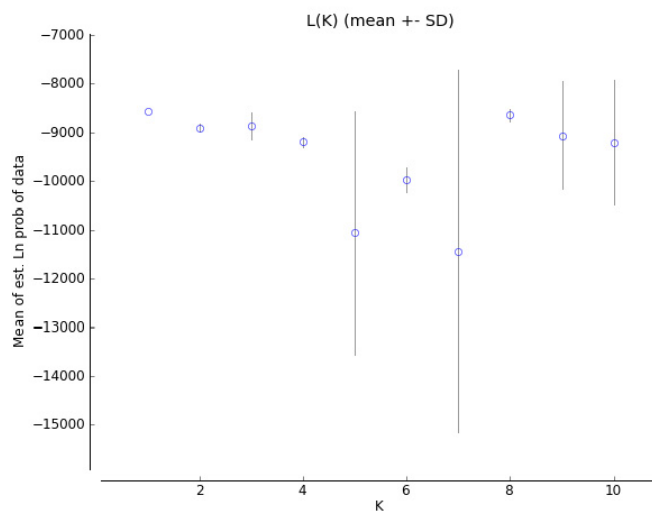
População	Out/10	Nov/10-Dez/10- Jan/11	Fev/11
Out/10		0,0000**	0,0000**
Nov/10-Dez/10- Jan/11	0,0445		0,0000**
Fev/11	0,0538	0,0358	

**Tabela 2.5.** Estimativas de diferenciação genética de Jost ( $D_{est}$ ) entre as populações Out/10; Nov/11-Dez/10-Jan/11; e Fev/11.

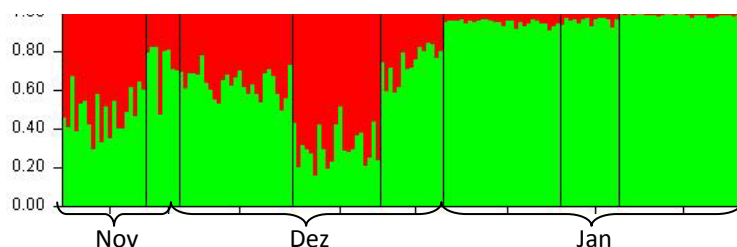
População	Out/10	Nov/10-Dez/10- Jan/11	Fev/11
Out/10			
Nov/10-Dez/10- Jan/11	0,046		
Fev/11	0,074	0,014	

Com a identificação de mais três grupos genéticos, os indivíduos amostrados nos meses de Nov/2010, Dez/2010 e Jan/2011 foram novamente analisados individualmente através do programa STRUCTURE. Apesar de verificarmos a indicação de uma única população ( $K=1$ ) através do gráfico  $L(K)$  (Figura 2.7), observamos uma ausência de estruturação nas populações amostrais Nov/10 e Dez/10 e uma indicação de separação entre os indivíduos correspondentes ao mês de janeiro/2010 (Figura 2.8).

**Figura 2.7.** Resultado da análise Bayesiana para a determinação do número de grupos para 166 indivíduos de *S. brasiliensis*, através do logaritmo da probabilidade média dos dados  $L(K)$ , indicando  $K=1$  como o valor mais provável. Deste modo não se aplica a correção de Evanno *et al.* (2005).



**Figura 2.8.** Probabilidades de atribuição de indivíduos de *S. brasiliensis* para  $K=2$ .



Os resultados de diferenciação de Jost são corroborados pelas estatísticas de  $F_{ST}$ , que encontraram diferenciação significativa entre os indivíduos amostrados em

Jan/2011, quando comparados par-a-par com indivíduos correspondentes a Nov/10 e Dez/2010. Os valores significativos para  $F_{ST}$  foram de 0,009 ( $p=0,008$ ) entre Nov/10 e Jan/11, e de 0,008 ( $p=0,001$ ) entre Dez/10 e Jan/11 (Tabela 2.6). A análise gráfica de correspondência fatorial revelou maior similaridade entre indivíduos das populações amostrais Nov/10 e Dez/10, e maior separação de Jan/11 (Figura 2.9). A AMOVA evidenciou que uma pequena porção significativa da variabilidade genética encontra-se entre as populações (0,72%,  $p=0.0013$ ) (Tabela 2.8).

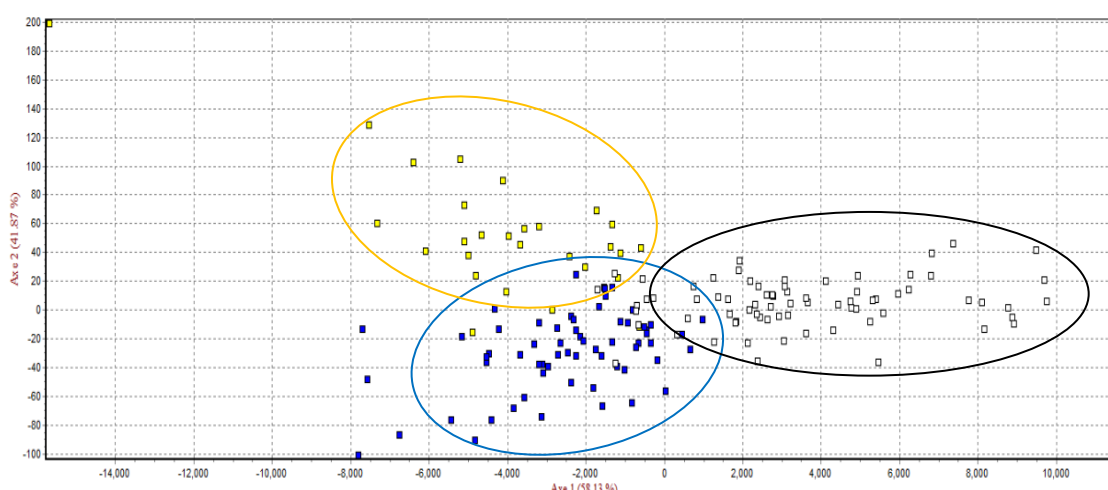
**Tabela 2.6.** Valores de  $F_{ST}$  par-a-par (abaixo da diagonal) e  $p$  (acima) entre populações de *S. brasiliensis* amostrados em Nov/10, Dez/10 e Jan/11. Valores significativos para  $p < 0,05$  (\*) e após correção de Bonferroni ( $p = 0,017$ ) (\*\*).

População	Nov/10	Dez/10	Jan/11
Nov/10		0,129	0,008**
Dez/10	0,004		0,001**
Jan/11	0,009	0,008	

**Tabela 2.7.** Estimativas de diferenciação genética de Jost ( $D_{est}$ ) entre as populações amostrais Nov/10, Dez/11 e Jan/12.

População	Nov/10	Dez/10	Jan/11
Nov/10			
Dez/10	0,001		
Jan/11	0,016	0,016	

**Figura 2.9.** Gráfico de análise de correspondência fatorial (FCA) para as populações amostrais Nov/10 (pontos em amarelo), Dez/10 (pontos em azul) e Jan/11 (pontos em branco).



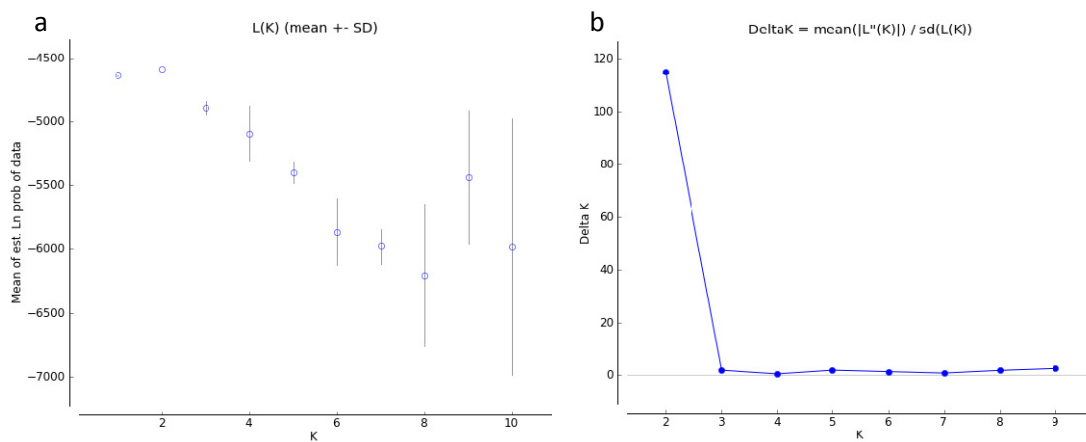
**Tabela 2.8.** Análises de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 2005) para populações amostrais Nov/10, Dez/10 e Jan/11. Os valores de *p* foram calculados a partir de um teste de permutação aleatória (20.000 repetições).

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação	Valor de <i>p</i>
Entre populações	12,751	0,0272	0,72	0,0013
Dentro das populações	1149,571	4,721	99,27	
Total	1162,322	3,748		

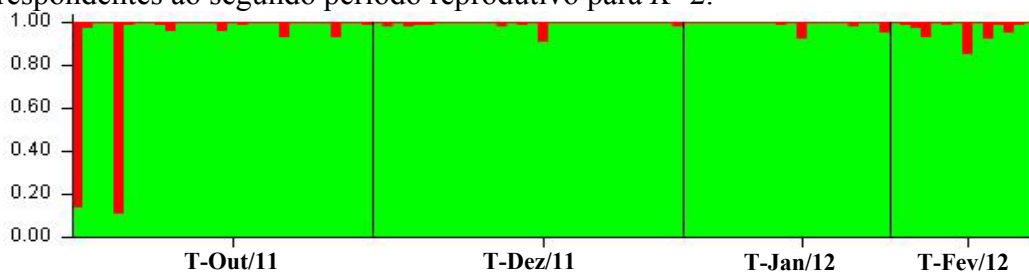
*Segundo Período Reprodutivo*

A análise Bayesiana em indivíduos amostrados no segundo período reprodutivo (PR/2011-2012) identificou a existência de dois grupos genéticos ( $K=2$ ) (Figura 2.10). Com base nas probabilidades de atribuição de genótipos (Figura 2.11) podemos observar que apenas dois indivíduos se diferenciam dos demais.

**Figura 2.10.** Resultado da análise Bayesiana para a determinação do número de grupos para 97 indivíduos de *S. brasiliensis* correspondentes ao segundo período reprodutivo (PR/2011-2012), através do logaritmo da probabilidade média dos dados  $L(K)$  (a), e valores de DeltaK segundo a correção de Evanno *et al.* (2005) (b).



**Figura 2.11.** Probabilidades de atribuição de indivíduos de *S. brasiliensis* correspondentes ao segundo período reprodutivo para  $K=2$ .



A análise de distância genética mostrou valores significativos de  $F_{ST}$  entre as populações amostrais Out/11 e Dez/11; Out/11 e Fev/12; Dez/11 e Jan/12 (Tabela 2.9). Apesar de serem baixos, os resultados da estimativa de diferenciação  $D_{est}$  corroboram com resultados de  $F_{ST}$  e sugerem diferenciação temporal também para indivíduos amostrados no segundo período (Tabela 2.10).

**Tabela 2.9.** Valores de  $F_{ST}$  par-a-par (abaixo da diagonal) e  $p$  (acima) entre as populações amostrais do segundo período reprodutivo (PR/2011-2012). Valores significativos para  $p < 0,05$  (\*) e após correção de Bonferroni ( $p = 0,0087$ ) (\*\*).

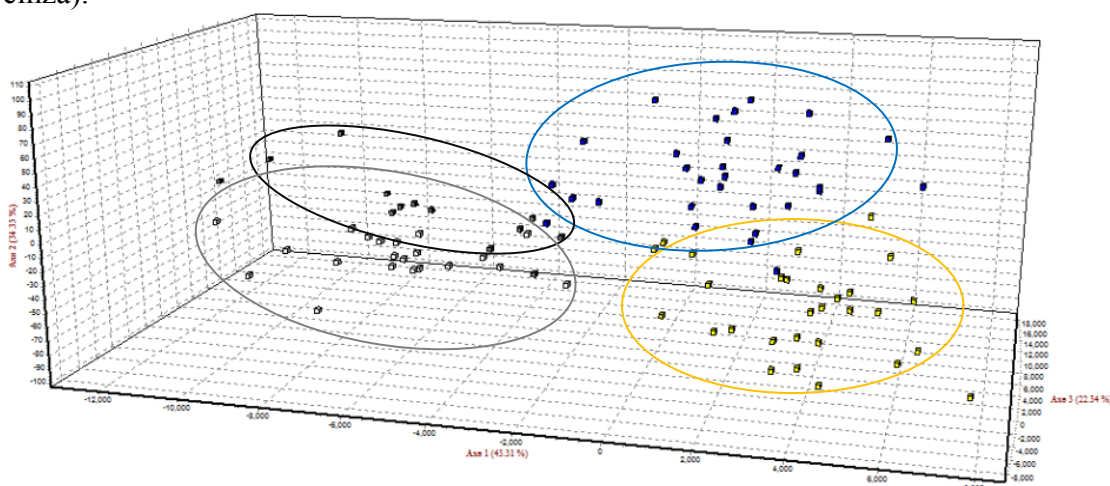
População	Out/11	Dez/11	Jan/12	Fev/12
Out/11		0,0527	0,0000**	0,0087**
Dez/11	0,013		0,0000**	0,0244*
Jan/12	0,067	0,053		0,4707
Fev/12	0,042	0,037	0,001	

**Tabela 2.10.** Estimativas de diferenciação genética de Jost ( $D_{est}$ ) entre as populações amostrais do segundo período reprodutivo (PR/2011-2012).

População	Out/11	Dez/11	Jan/12	Fev/12
Out/11				
Dez/11	0,013			
Jan/12	0,056	0,033		
Fev/12	0,033	0,035	0,015	

O resultado obtido pelo gráfico da análise de correspondência fatorial permite a visualização de três grupos principais, um deles composto por uma sobreposição entre os indivíduos correspondentes a Jan/12 e Fev/12, e a separação dos indivíduos de Out/11 e Dez/11 (Figura 2.12).

**Figura 2.12.** Gráfico de análise de correspondência fatorial (FCA) para indivíduos amostrados no segundo período reprodutivo (PR/2011-2012): Out/11 (pontos em amarelo), Dez/11 (pontos em azul), Jan/12 (pontos em branco) e Fev/12 (pontos em cinza).



A partir da congruência dos resultados obtidos pelas análises Bayesiana, de distância genética ( $F_{ST}$ ), de diferenciação genética ( $D_{est}$ ) e de correspondência fatorial (FCA) foi possível definir o número de grupos populacionais de *S. brasiliensis* para os dois períodos reprodutivos analisados. Determinamos a existência de quatro populações para o primeiro período: PR1-1 (Out/10), PR1-2 (Nov/10-Dez/10), PR1-3 (Jan/11) e PR1-4 (Fev/11); e duas populações para o segundo período reprodutivo: PR2-1 (Out/11 e Dez/11) e PR2-2 (Jan/12-Fev/12).

A análise de distância genética entre as seis populações apresentaram valores de  $F_{ST}$  par-a-par variando de 0,008 a 0,076 (Tabela 2.11). Todas as comparações de  $F_{ST}$  foram significativas ao nível de 5%, porém, após a correção de Bonferroni as populações PR2-1 e PR2-2 não apresentaram distância significativa ( $p= 0,0150$ ). A diferenciação  $D_{est}$  entre as seis populações foi baixa a moderada, com média de 0,123 (0,049 a 0,403), e valores de comparações par-a-par variando entre 0,011 a 0,546 (Tabela 2.12). AMOVA indicou que 4,33% da variação encontrada foi observada entre as populações (Tabela 2.13).

**Tabela 2.11.** Valores de  $F_{ST}$  par-a-par (abaixo da diagonal) e  $p$  (acima da diagonal) entre as seis populações de *S. brasiliensis* identificadas nos dois períodos reprodutivos estudados (PR/2010-2011 e PR/2011-2012) no alto e médio rio Uruguai-Brasil. Valores significativos para  $p<0,05$  (\*) e após correção de Bonferroni ( $p= 0,0033$ ) (\*\*).

População	PR1-1	PR1-2	PR1-3	PR1-4	PR2-1	PR2-2
PR1-1		0,0000**	0,0000**	0,0000**	0,0000**	0,0000**
PR1-2	0,043		0,0000**	0,0000**	0,0000**	0,0000**
PR1-3	0,049	0,008		0,0000**	0,0000**	0,0000**
PR1-4	0,053	0,032	0,043		0,0000**	0,0000**
PR2-1	0,044	0,076	0,075	0,072		0,0150*
PR2-2	0,019	0,068	0,067	0,049	0,007	

**Tabela 2.12.** Estimativas de diferenciação genética de Jost ( $D_{est}$ ) entre as seis populações de *S. brasiliensis* identificadas para os dois períodos reprodutivos analisados (PR/2010-2011 e PR/2011-2012) no alto e médio rio Uruguai, Brasil.

População	PR1-1	PR1-2	PR1-3	PR1-4	PR2-1	PR2-2
PR1-1						
PR1-2	0,056					
PR1-3	0,490	0,015				
PR1-4	0,546	0,011	0,028			
PR2-1	0,500	0,150	0,144	0,177		
PR2-2	0,430	0,149	0,135	0,118	0,028	

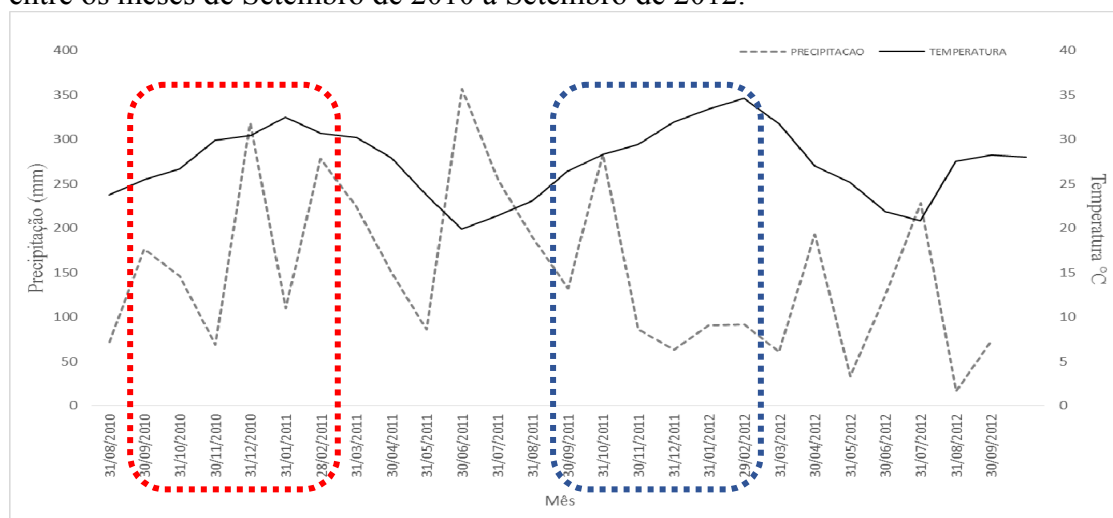
**Tabela 2.13.** Análises de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 2005) entre seis populações de *S. brasiliensis* identificadas para os dois períodos reprodutivos analisados (PR/2010-2011 e PR/2011-2012).

Fonte da variação	Componentes da variância	Porcentagem da variação	Valor de <i>p</i>
Entre populações	0,169	4,33	0,0104
Dentro das populações	3,754	95,67	
Total	3,924		

### Parâmetros ambientais

Os resultados de precipitação (mm) e da temperatura (°C) para o período estudado na região do alto rio Uruguai podem ser visualizados na Figura 2.13. Para o primeiro período reprodutivo, foram observados três picos de precipitação entre os meses de outubro/2010 e fevereiro/2011: o primeiro entre setembro e outubro/2010, o segundo em dezembro/2010 e o terceiro em fevereiro/2011. Os valores de temperatura (°C) apresentaram um aumento gradual durante a estação reprodutiva, com valor máximo observado no mês de janeiro/2011. Os resultados correspondentes ao segundo período reprodutivo, entre os meses de outubro/2011 e fevereiro/2012, revelaram apenas um pico de chuvas ocorrido no mês de outubro/2011 (Figura 2.13). Os valores de temperatura também aumentaram gradativamente, com valor máximo registrado no mês de fevereiro/2012. Valores de condutividade variaram entre 53 e 92  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , seguindo um gradiente de aumento similar ao da temperatura, sem a presença de alterações durante a estação reprodutiva.

**Figura 2.13.** Gráficos da variação mensal dos valores médios de precipitação (mm) e da temperatura (°C) na região do alto rio Uruguai-Brasil. (a) Resultados da variação média entre os meses de Setembro de 2010 a Setembro de 2012.



Fonte: Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa, do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).



### 2.3 DISCUSSÃO

Identificamos isolamento por tempo entre populações durante o período reprodutivo, variação genética temporal entre populações de diferentes períodos reprodutivos e ausência de estruturação espacial para *S. brasiliensis* na bacia do alto e médio rio Uruguai.

Pesquisas direcionadas ao estudo de espécies de peixes que habitam grandes rios nem sempre são fáceis, resultando em grandes variações no tamanho amostral devido à dificuldade de captura. Durante o início das análises laboratoriais não havia marcadores específicos disponíveis para espécie, necessitando deste modo, o uso de marcadores heterólogos desenvolvidos para *S. franciscanus*, *S. hilarii* e *B. opalinus*. Sabe-se que o uso de marcadores heterólogos pode aumentar as chances da presença de alelos nulos e podem dificultar a interpretação dos dados. No entanto, testes de transferibilidade foram realizados com sucesso para *S. brasiliensis* (ROSSINI, 2010). A análise de diversidade genética das populações amostrais indicou altos valores de heterozigosidade esperada e observada (média de 0,825 e 0,852, respectivamente), além de um elevado número de alelos (média de 11 alelos/loco). A diversidade genética encontrada foi similar a valores descritos para outras espécies de peixes migradores Neotropicais. Matsumoto e Hilsdorf (2009) encontraram valores de heterozigosidade esperada variando de 0,72 a 0,83 e heterozigosidade observada entre 0,77 a 0,90, para *Brycon insignis*. Para *B. hilarii* na Bacia do rio Miranda, Sanches e Galetti Jr. (2012) relataram valores de heterozigosidade inferiores aos relatados no presente trabalho ( $He= 0,66-0,67$ ;  $Ho= 0,59-0,61$ ). Elevados valores de diversidade genética são essenciais para permitir que as populações tenham viabilidade biológica e se adaptem a alterações ambientais (ALLENDORF; RYMAN, 2002; LAIKRE *et al.*, 2005).

Através da análise Bayesiana foi possível identificar duas principais populações genéticas entre as 18 populações amostrais, formadas basicamente por indivíduos do primeiro e do segundo períodos reprodutivos. Os resultados obtidos para os indivíduos do primeiro período reprodutivo revelaram a presença de uma população geneticamente distinta no início da estação de desova (outubro/10), outra no período intermediário, correspondente aos meses de novembro/10, dezembro/10 e janeiro/11, e uma terceira população formada por indivíduos representantes do final da estação de desova (fevereiro/2011). Essas populações identificadas são resultantes, provavelmente, de

grupos de indivíduos que se reproduzem em diferentes momentos durante o período reprodutivo, corroborando com a hipótese para este trabalho. Godoy (1975) estudou a migração de peixes reofilicos na Cachoeira de Emas na bacia do rio Mogi-Guaçu e observou a ocorrência de cardumes tardios e precoces de dourados, além de relatar a ocorrência de desova durante os meses de novembro, dezembro e janeiro, momento que também relatou aumento nos níveis do rio, que segundo o autor, é o estímulo principal para a desova de peixes migradores.

A diferenciação dos indivíduos amostrados entre os meses de novembro/10 e janeiro/11 apresentaram estruturação menos evidente, que não foi detectada através da análise Bayesina. Os valores de  $F_{ST}$  se mostraram altamente significativos, revelando que indivíduos amostrados em novembro/2010 e dezembro/2010 constituem uma única população e que a mesma se diferencia geneticamente dos indivíduos amostrados em janeiro 2011 (Tabela 2.5). Os baixos valores de  $F_{ST}$  e de  $D_{est}$  refletem o resultado obtido pelo programa STRUCTURE, que não detectou a diferenciação entre as populações. Muitas vezes a análise Bayesiana não consegue detectar diferenciações muito sutis, mas que podem ser identificadas pelo  $F_{ST}$  (FALUSH *et al.*, 2007). A análise de correspondência fatorial, assim como os valores de  $F_{ST}$  e  $D_{est}$ , sugere maior diferenciação entre os indivíduos de janeiro/11 em comparação aos demais. Os valores significativos de  $F_{ST}$  encontrados entre as populações de *S. brasiliensis* foram baixos, similares aos encontrados para outros estudos com populações de peixes (HATANAKA *et al.*, 2006; SANCHES; GALETTI JR., 2012). Estruturação genética em populações reprodutivas também foi referida para *Prochilodus marggravii* na região sob influência da barragem de Três Marias, no rio São Francisco (HATANAKA; GALETTI JR., 2003). Os autores sugeriram, pela primeira vez para peixes Neotropicais, a hipótese de existirem diferenças genéticas entre populações durante o período reprodutivo. Este padrão de estruturação também foi encontrado para *Prochilodus argenteus*, no rio São Francisco (HATANAKA *et al.*, 2006), que, como no presente estudo, detectaram valores de  $F_{ST}$  baixos, porém significativos entre as populações amostrais ( $F_{ST}= 0,008$ ;  $p= 0,000$ ). Diferenciações sutis também foram encontradas por Melo *et al.* (2013) para populações de *Prochilodus costatus* na bacia do médio rio São Francisco. Foram detectadas oito combinações significativas de  $F_{ST}$ , de um total de 10 populações amostrais analisadas.

Estruturações genéticas com baixos valores de  $F_{ST}$  são comumente detectadas em espécies marinhas com comportamento migratório (PAPA *et al.*, 2007; HAUSER; CARVALHO, 2008; KOVACH *et al.*, 2013). Populações distintas de *Gadus morhua* amostradas de um complexo de desova apresentaram pequenos valores de distância genética, com baixos valores de  $F_{ST}$  (0,0039 a 0,0061), porém altamente significativos (KOVACH *et al.*, 2013). Estudando a estruturação genética entre um cardume reprodutivo e amostras oriundas de diversos pontos amostrais Sanches e Galetti Jr. (2012) encontraram valores baixos e significativos de distância genética ( $F_{ST}= 0,0317$ ,  $p= 0,000$  e  $F_{ST}= 0,0273$ ,  $p= 0,006$ ) para indivíduos de *B. hilarii* na bacia do rio Paraguai. Baixos valores de  $F_{ST}$  não podem ser negligenciados (WRIGHT, 1978), pois podem indicar uma diferenciação importante, sendo necessário avaliar o significado biológico dessa estruturação (WAPLES, 1998; JØRGENSEN *et al.*, 2005b). A teoria de que populações de peixes migradores Neotropicais possam coexistir em um mesmo sistema hidrográfico, sugerida por Hatanaka e Galetti Jr. (2003) e Hatanaka *et al.*, (2006), também foi proposto por Sanches e Galetti Jr. (2007, 2012). De acordo com os últimos autores, peixes migradores se organizam em unidades reprodutivas geneticamente diferenciadas, coexistindo através do sistema hidrográfico que habita. Esta indicação da ocorrência de diferentes populações habitando em um único sistema pode explicar os valores de  $F_{ST}$ , que apesar de baixos, detectam importantes diferenciações populacionais.

Os resultados do presente trabalho detectaram a existência de pelo menos quatro populações de *S. brasiliensis* durante o período reprodutivo de 2010/2011. Uma população foi identificada no início da temporada reprodutiva, outras duas populações formadas por indivíduos amostrados durante o período intermediário e uma quarta população constituída por peixes correspondentes ao final da estação de desova, indicando a existência de um isolamento temporal. Este mecanismo de isolamento reprodutivo temporal é chamado de IBT (*isolation-by-time*), e ocorre quando indivíduos da mesma espécie reproduzem na mesma área, porém em momentos diferentes da mesma estação reprodutiva. O conceito *isolation-by-time* foi introduzido por Hendry *et al.* (1999) para descrever o fluxo gênico restrito entre peixes que reproduzem em diferentes momentos do período reprodutivo. Esta característica pode apresentar uma tendência hereditária, gerando proles com característica semelhantes, diminuindo assim o fluxo gênico e aumentando a variação entre esses grupos (HENDRY *et al.* 1999;

HENDRY; DAY, 2005). A ocorrência de quatro populações geneticamente distintas no primeiro período reprodutivo sugere que existam agrupamentos reprodutivos de *S. brasiliensis* no alto e médio rio Uruguai, e que existem mecanismos para que os indivíduos se organizem, de modo a manterem populações distintas. Algumas espécies de peixes que vivem em agregações podem reconhecer seus parentes e manter as populações através do reconhecimento de estímulos químicos (BEHRMANN-GODEL *et al.*, 2006). Além disso, comportamentos cooperativos como a formação de cardume aumentam a aptidão dos indivíduos e podem ser benéficos para a manutenção da espécie (QUINN; BUSACK, 1985) e aumentar o número e a qualidade da progênie (EBERHARD; CORDERO, 1995).

Não foi observada estruturação espacial através da análise Bayesiana nem através das análises de diferenciação genética. Os valores de  $F_{ST}$  não foram significativos e os resultados de  $D_{est}$  foram próximos de zero, descartando a possibilidade de isolamento por distância na região estudada. Os pontos amostrais mais distantes estão localizados a aproximadamente 250 km entre si e a ausência de isolamento por distância pode ser facilmente entendida pela excelente capacidade migratória de *S. brasiliensis*, que pode percorrer até 51,4 km por dia (HAHN *et al.*, 2011).

Já para os peixes correspondentes à segunda temporada reprodutiva, a análise Bayesiana detectou a presença de duas populações ( $K=2$ ). Contudo, o gráfico de probabilidades indicou que essas duas populações são formadas pela diferenciação entre dois indivíduos e os demais. Esses dois indivíduos foram amostrados no mês de outubro/2011 e podem ser indivíduos migrantes, representantes de outras populações. Os resultados de  $F_{ST}$  revelaram a formação de dois grupos genéticos, formados por indivíduos de outubro/11 e dezembro/11, e por peixes coletados em janeiro/12 e fevereiro/12. O resultado da diferenciação de Jost e a análise de correspondência fatorial corroboram com os resultados de  $F_{ST}$ . O número de populações identificadas no segundo período reprodutivo estudado foi menor e menos evidente que para o primeiro período reprodutivo. Esses resultados parecem estar relacionados com os volumes de chuva para cada um dos períodos estudados. A relação entre início de migração reprodutiva dos cardumes e o aumento do fluxo da água já foi muito discutida para peixes migradores (GODOY, 1975; VAZZOLER, 1996). Para o primeiro período reprodutivo, os dados meteorológicos indicaram três picos de precipitação na região

estudada. Em contrapartida, no segundo período houve apenas um pico de precipitação ocorrido no mês de outubro/2011. O maior número de populações identificadas no primeiro período reprodutivo pode ser resultado de diferentes cardumes de peixes que iniciaram a migração após o estímulo recebido pelo aumento do nível do rio em diferentes momentos. A precipitação exerce um papel fundamental na reprodução de espécies migradoras, disponibilizando maior quantidade de sólidos em suspensão na água e conseqüentemente reduzindo sua transparência, aumentando as chances de sobrevivência dos ovos e larvas (BARBIERI *et al.*, 2000). A manutenção da diferenciação genética entre as populações analisadas no presente trabalho parece estar diretamente relacionada com os fatores ambientais, como a ocorrência de chuvas e aumento dos níveis do rio, desencadeando a migração das distintas populações de peixes. Um período reprodutivo com vários picos de chuvas pode propiciar o início da migração, e possivelmente a reprodução, de várias populações durante a estação reprodutiva.

Foi possível identificar seis populações geneticamente distintas entre as 18 populações amostrais de *S. brasiliensis* analisadas. As distâncias genéticas entre elas foram baixas (0,007 a 0,075; Tabela 2.9), mas foram significativas e indicam que existem diferenças entre os cardumes reprodutivos, que podem ser encontrados em períodos distintos da estação de desova. A forma de organização de peixes migradores é algo que instiga pesquisadores há muitos anos. O conhecimento sobre a estrutura genética e como a variação se distribui em populações naturais são essências para o entendimento da biologia da espécie, pois ajuda a compreender o modo de reprodução, além de servirem de base para programas de conservação (MORITZ, 1994; PAETKAU, 1999). O presente trabalho contribui para entendimento sobre o modo de organização das populações de peixes migradoras Neotropicais, pois revela que existem diversas populações temporais. Essa informação deve ser considerada para a geração de diretrizes como a formação e manutenção de bancos genético e escolha de reprodutores para programas de repovoamento, aonde diversas populações precisam ser amostradas ao longo do período reprodutivo buscando uma maior amostragem da diversidade genética.

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES  
NÃO-REPRODUTIVAS DE DOURADO,  
(*Salminus brasiliensis*) NA BACIA DO  
ALTO E MÉDIO RIO URUGUAI**



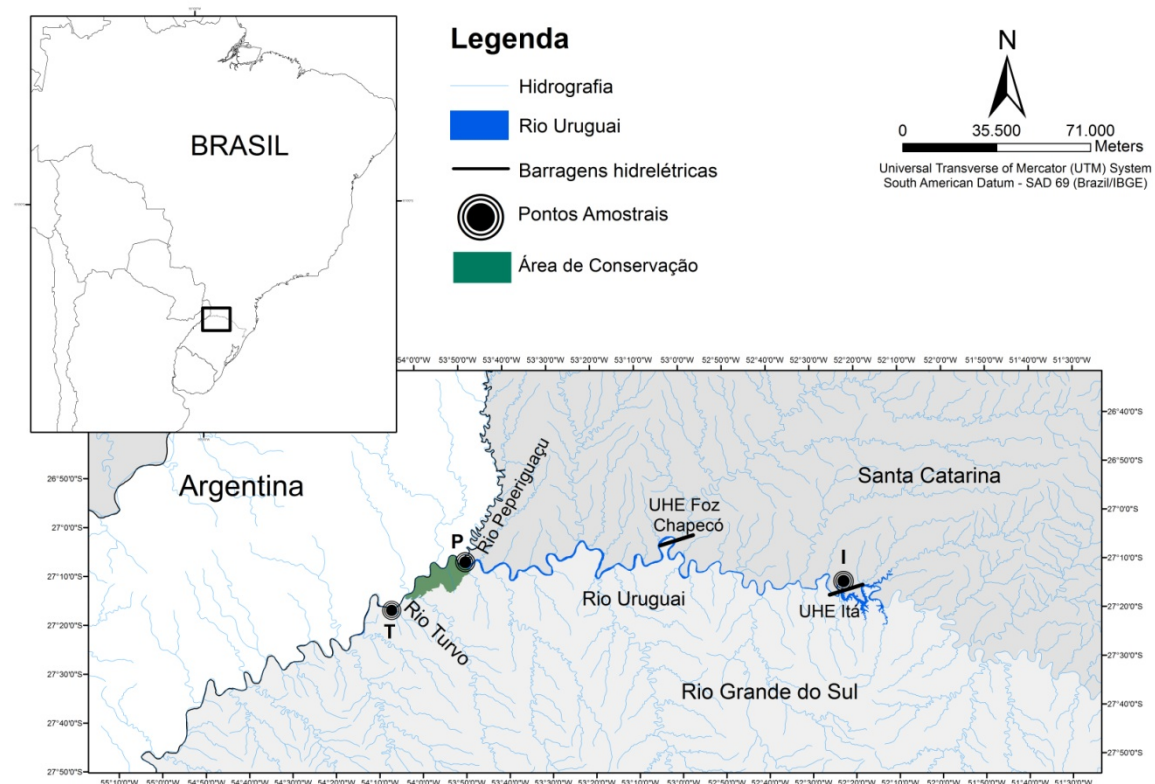
### 3. Estrutura genética em populações não-reprodutivas de dourado, (*Salminus brasiliensis*) na bacia do alto e médio rio Uruguai

#### 3.1 MATERIAL E MÉTODOS

##### 3.1.1 Amostragem

Um total de 119 indivíduos de *S. brasiliensis* foi coletado durante o período não-reprodutivo (PNR) de 2011 e 2012, no alto e médio rio Uruguai. A coleta dos indivíduos do PNR/2011 foi realizada no mês de julho, em três pontos amostrais distintos: I - a jusante da UHE de Itá, no município de Itá (SC); P- próximo à foz do rio Peperiguaçu, localizado no município de Itapiranga (SC) e T - na foz do rio Turvo, no município de Esperança do Sul (RS) (Figura 2.1). A amostragem PNR/2012 foi conduzida apenas no ponto próximo à foz do rio Turvo, no município de Esperança do Sul-RS (T).

**Figura 3.1.** Mapa de localização dos pontos amostrais de *S. brasiliensis* na bacia do alto e médio rio Uruguai, Brasil. Mapa obtido a partir da base temática do LAPAD-UFSC. I: Jusante da UHE Itá; P: Foz do rio Peperiguaçu e T: Foz do rio Turvo.



Fonte: LAPAD/UFSC

A coleta das amostras foi realizada com auxílio do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixe de Água Doce (LAPAD), da Universidade Federal de Santa Catarina, e de pescadores ribeirinhos locais. Os peixes foram capturados através de molinete e de espinheis. Após a retirada de um pequeno fragmento da nadadeira caudal (aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>), os peixes foram soltos no rio. Todas as amostras de tecido foram imediatamente preservadas em álcool absoluto e posteriormente armazenadas em freezer (-20°C). Detalhes do número amostral de cada ponto e período de coleta podem ser visualizados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Amostras de *S. brasiliensis* utilizados no presente estudo. Ponto amostral localizado a Jusante da UHE Itá (I) (divisa dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul-Brasil), e os pontos amostrais na Foz do rio Peperiguaçu (P) e na Foz do rio Turvo (T) (divisa entre o Brasil e a Argentina). Número amostral (N).

Local	Coordenada Geográfica	Período da amostragem	Código	N
Jusante UHE Itá (I)	27°17'32'' S 52°23'42'' W	Julho-2011	I-PNR/2011	30
Foz do rio Peperiguaçu	27°10' 03.81'' S 53°50'07'' W	Julho-2011	P-PNR/2011	26
Foz do rio Turvo (T)	27°15' 50.16'' S 54°03' 16.97'' W	Julho-2011	T-PNR/2011	20
Foz do rio Turvo (T)		Julho-2012	T-PNR/2012	43

### 3.1.2 Extração do DNA e amplificação dos locos de microssatélites

O DNA genômico dos indivíduos foi extraído a partir de um fragmento de nadadeira, através da metodologia descrita por Aljanabi e Martinez (1997). A integridade do DNA obtido foi avaliada mediante eletroforese em gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e a concentração do DNA foi obtida em biofotômetro. O DNA de trabalho foi diluído em água Milli-Q a uma concentração de aproximadamente 30ng/μl.

Foram utilizados 11 *primers* heterólogos de microssatélites para caracterizar as populações amostrais. Sete *primers* utilizados foram desenvolvidos para *S. franciscanus*: Sfra02, Sfra10, Sfra13, Sfra03, Sfra04, Sfra18, Sfra14 (ROSSINI *et al.*, 2010); um para *S. hilarii*: Sh56 (SILVA; HILSDORF, 2011) e um para *B. opalinus*: BoM2 (BARROSO *et al.*, 2003) (detalhes no Anexo 2). As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 10μl contendo 30ng de DNA molde, 1X de *GoTaq® Colorless Master Mix 2X* (Promega), 8pmol do iniciador M13 com



fluorescência (FAM, TET ou HEX), 8pmol do iniciador *forward*; 2pmol do iniciador *reverse* (com a sequência da cauda M13). Os programas de amplificação seguiram o seguinte padrão: 5 minutos a 94°C seguidos por 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos na temperatura de anelamento específico de cada *primer*, 45 segundos a 72°C; 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C; e um ciclo final de 10 minutos a 72°C. As genotipagens foram realizadas em sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare Life Science) e a leitura dos alelos foi realizada através do programa *Fragment Profiler Software Suite v1.2* (GE Healthcare Life Science) com ET-ROX 550-R como tamanho padrão.

### 3.1.3 Estimativa dos níveis de diversidade genética e estruturação populacional

A presença de alelos nulos foi verificada através do programa MICROCHECKER (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). O número de alelos ( $A$ ) e os valores da heterozigosidade esperada ( $He$ ) e observada ( $Ho$ ) foram estimados através do programa GENALEX 6.5 (PEAKALL, SMOUSE, 2012). A estimativa da riqueza alélica ( $Ra$ ) e o índice de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), juntamente com os valores de  $p$  para o excesso e para o déficit de heterozigotos, foram calculados no programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001). Testes para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e testes de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos foram realizados através do programa GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Correções para testes múltiplos foram feitas seguindo o procedimento de Bonferroni ( $k$ ) (RICE, 1989).

O programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000; FALUSH *et al.*, 2003) foi utilizado para determinar a estruturação genética populacional, através da técnica de *clusters* bayesianos, juntamente com o algoritmo Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC). A análise para determinar o número de populações foram realizadas sem informação *a priori* da origem dos indivíduos, com o modelo de mistura das populações, com a opção de frequências alélicas correlacionadas. Para cada valor de  $K$  (1 a 10) foram realizadas seis corridas independentes, e para cada uma delas foram realizadas 1.000.000 cadeias de Markov-Monte Carlo, após um período de corte inicial (*burn-in*) de 200.000 interações. O logaritmo da probabilidade dos dados  $\ln P(D/K)$  (PRITCHARD *et al.*, 2000) e as estimativas de DeltaK (EVANNO *et al.*, 2005) foram determinadas através do programa Structure Harvester (EARL, 2012).

Os valores de  $F_{ST}$  (WEIR; COCKERHAM, 1984) para combinações par-a-par entre as populações amostrais foram obtidos através do programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005), com correções para testes múltiplos (RICE, 1989). Estimativas de diferenciação genética de Jost ( $D_{est}$ ), realizada entre pares de populações amostrais, foram obtidas através do programa SMOGD v1.2.5 (CRAWFORD, 2010), com 1.000 réplicas de *bootstrap*. O teste de atribuição foi realizado no programa GENALEX 6.5 (PEAKALL, SMOUSE, 2012), para identificar a validade das populações amostrais, ou seja, definidas previamente. A análise da variância molecular (AMOVA) foi realizada no programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005). A análise de correspondência multidimensional fatorial (FCA) foi obtida através do programa GENETIX 4.02 (BELKHIR *et al.*, 2004).

Informações sobre os parâmetros ambientais foram obtidas a partir da estação climatológica 83881, que está localizada no município de Iraí-RS, através do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa, do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 Diversidade genética e estrutura populacional

Estimamos os parâmetros genético populacionais para as quatro populações amostrais de *S. brasiliensis*, através de 11 locos de microssatélites. Todos os locos foram altamente polimórficos, e um total de 204 alelos foi detectado para todos os locos em todas as populações amostrais. O número de alelos por loco variou de seis (Sfra18, I-PNR/2011; Sh56, P-PNR/2011) a 31 alelos (Sfra02 e Sh56, T-PNR/2012). O sumário dos resultados pode ser visualizado na Tabela 3.2. A população T-PNR/2012 apresentou o maior número de alelos exclusivos (26), e as populações amostrais I-PNR/2011, P-PNR/2011, T-PNR/2011 apresentaram 20, 11 e seis alelos, respectivamente. Três alelos exclusivos se apresentaram com maior frequência: o alelo 154 e 162 (loco Sfra18) com frequência de 17,4% e 8,1%, respectivamente e o alelo 178 (Sfra04) com frequência de 11,6%, todos identificados para a população T-PNR/2012. Os demais alelos exclusivos apresentaram baixa frequência de ocorrência (inferior a 0,050).

O programa MICROCHECKER detectou déficit de heterozigotos nos locos Sfra05, (população amostral I-PNR/2011) e Sfra15 (população amostral T-PNR/2012). Foram

detectados desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg em I-PNR/2011 (loco Sfra15), P-PNR/2011 (locos Sfra02 e Sfra15), T-PNR/2011 (locos Sfra04 e Sfra15) e na população amostral T-PNR/2012 (locos Sfra02, Sfra04 e Sfra15). Não detectamos desequilíbrio de ligação para os pares de locos analisados. Os grupos amostrais apresentaram  $H_e$  média de 0,848 e  $H_o$  média de 0,844 (Tabela 3.2). O coeficiente de endocruzamento  $F_{IS}$  indicou déficit de heterozigotos nos locos Sfra02 (população amostral T-PNR/2012) e Sfra05 (população amostral I-PNR/2011).

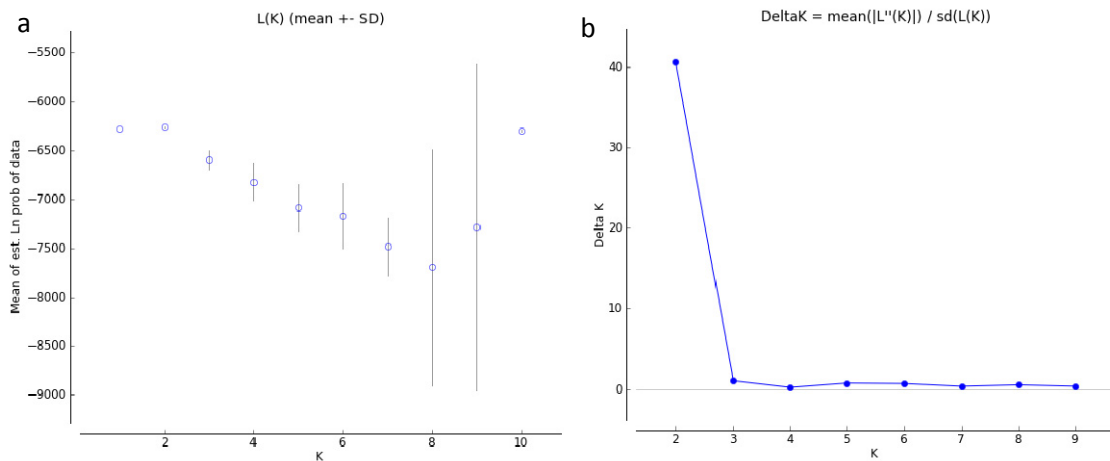
**Tabela 3.2.** Parâmetros de variação genética nas populações amostrais de *S. brasiliensis* da bacia do alto e médio rio Uruguai, baseados em 11 locos de microssatélites. Para cada loco apresentam-se: o número de indivíduos analisados ( $N$ ), o número de alelos ( $A$ ), a riqueza alélica ( $Ra$ ), a heterozigosidade observada ( $Ho$ ) e esperada ( $He$ ), o coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Valores significativos para  $P_{EHW}$  são apresentados com asterisco (\*); valores significativos para  $F_{IS}$  estão em negrito, e valores com déficit de heterozigotos estão em itálico. Valores de  $p$  ajustado para análises múltiplas ( $p=0,0003$ ).

	Locos de microssatélites										
	Sfra02	Sfra10	Sfra13	Sfra03	Sfra04	Sfra18	Sfra05	Sfra14	Sfra15	BoM2	Sh56
<b>I-PNR/2011</b>											
$N$	27	28	27	30	30	29	28	27	26	29	25
$A$	25	11	20	13	10	6	13	19	19	8	16
$Ra$	18,76	8,96	16,15	10,64	8,14	5,33	10,99	14,94	15,24	6,9	13,43
$Ho$	0,926	0,857	1,000	0,9	0,7	0,483	0,571	0,889	0,692	0,828	0,88
$He$	0,938	0,828	0,926	0,848	0,789	0,576	0,865	0,915	0,871	0,793	0,89
$F_{IS}$	0,031	-0,017	-0,061	-0,044	0,130	0,179	0,355*	0,047	0,224	-0,027	0,032
$P_{EHW}$	0,328	0,06	0,815	0,082	0,038	0,026	0,009	0,053	<b>0,000</b>	0,383	0,011
<b>P-PNR/2011</b>											
$N$	26	26	26	26	26	26	26	26	25	24	23
$A$	27	11	16	16	11	7	10	17	20	9	6
$Ra$	20,82	8,55	13,83	13,08	9,26	6,16	9,05	13,39	16,11	8,36	5,61
$Ho$	0,962	0,808	0,962	0,846	0,654	0,692	0,808	0,846	0,76	0,875	0,957
$He$	0,95	0,803	0,912	0,891	0,837	0,657	0,86	0,891	0,913	0,788	0,777
$F_{IS}$	0,007	0,014	-0,035	0,069	0,238	-0,034	0,081	0,069	0,187	-0,089	-0,21
$P_{EHW}$	<b>0,000</b>	0,138	0,407	0,184	0,026	0,218	0,475	0,184	<b>0,000</b>	0,069	0,334
<b>T-PNR/2011</b>											
$N$	18	20	20	20	16	18	20	18	17	19	20
$A$	19	8	21	14	8	6	8	16	16	7	7
$Ra$	17,74	7,4	18,47	12,16	8	5,77	7,76	15,39	15,64	6,94	6,56
$Ho$	0,889	0,95	0,95	0,75	0,813	0,444	0,65	0,944	0,765	0,842	0,9
$He$	0,915	0,794	0,933	0,855	0,848	0,494	0,833	0,918	0,913	0,777	0,791
$F_{IS}$	0,057	-0,172	0,007	0,148	0,074	0,128	0,243	0,000	0,192	-0,057	-0,112

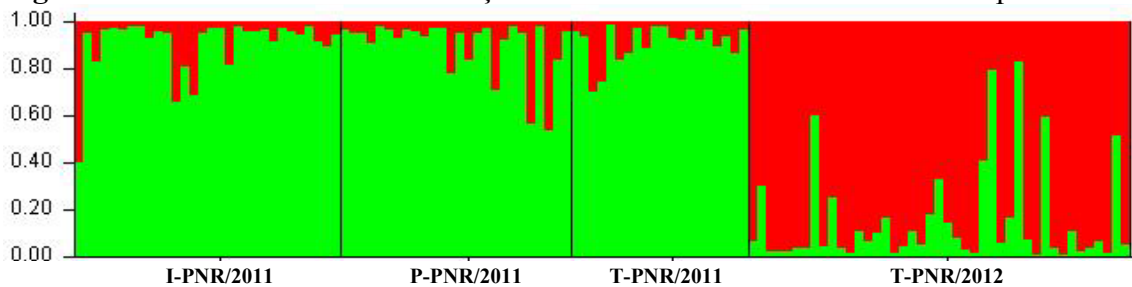
$P_{EHW}$	0,069	0,160	0,429	0,039	<b>0,007</b>	0,150	0,027	0,278	<b>0,000</b>	0,678	0,574
<b>P-PNR/2012</b>											
$N$	42	42	43	43	43	43	42	42	43	40	40
$A$	31	9	23	17	10	12	15	23	31	9	7
$Ra$	20,04	6,62	17,04	11,14	7,76	8,39	10,06	15,46	19,7	6,96	6,78
$Ho$	0,738	0,714	0,977	0,884	0,744	0,698	0,762	0,976	0,907	0,725	0,9
$He$	0,954	0,771	0,941	0,81	0,768	0,745	0,827	0,923	0,951	0,751	0,799
$F_{IS}$	0,238	0,085	-0,026	-0,079	0,043	0,076	0,091	-0,045	0,058	0,047	-0,114
$P_{EHW}$	<b>0,000</b>	0,423	0,699	0,93	<b>0,000</b>	0,005	0,046	0,170	<b>0,000</b>	0,829	0,082

Detectou-se déficit de heterozigotos para o loco Sfra15 em todas as populações amostrais analisadas (Tabela 3.2). A presença de déficit de heterozigoto em todas as populações indica possível existência de alelos nulos, e por este motivo, o loco Sfra15 foi retirado das análises de estruturação populacional. A existência de estruturação populacional foi investigada através de uma análise Bayesiana realizada através do programa STRUCTURE, com ausência de informação *a priori* sobre a origem dos indivíduos. Os resultados das estimativas de Ln(K) e DeltaK obtidos a partir da análise de todos os indivíduos amostrados revelou a existência de dois grupos genéticos ( $K=2$ ) (Figura 3.2). O gráfico de atribuição dos indivíduos permite a visualização das duas populações estruturadas (Figura 3.3).

**Figura 3.2.** Resultado da análise Bayesiana de estruturação genética para a determinação do número de grupos em 119 indivíduos, através do logaritmo da probabilidade média dos dados L(K) (a) e valores de DeltaK (b) segundo a correção de Evanno *et al.* (2005).



**Figura 3.3.** Probabilidades de atribuição de 119 indivíduos de *S. brasiliensis* para  $K=2$ .



Os resultados de  $F_{ST}$  e  $D_{est}$  par-a-par corroboraram os resultados obtidos com o gráfico de L(K) e indicaram a existência de duas populações geneticamente estruturadas (Tabela 3.3 e 3.4). Os valores de  $F_{ST}$  foram altamente significativos entre indivíduos amostrados em 2011 e 2012 ( $p= 0,0000$ ) (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3.** Valores de  $F_{ST}$  par-a-par (abaixo da diagonal) e  $p$  (acima) entre as populações amostrais I-PNR/2011, P-PNR/2011, T-PNR/2011 e T-PNR/2012. Valores significativos para  $p < 0,05$  (\*) e após correção de Bonferroni (\*\*) (nível ajustado de significância para comparações múltiplas ( $p = 0,008$ )).

População	I-PNR/2011	P-PNR/2011	T-PNR/2011	T-PNR/2012
I-PNR/2011		0,298	0,150	0,0000*
P-PNR/2011	0,0008		0,366	0,0000*
T-PNR/2011	0,0036	-0,0001		0,0000*
T-PNR/2012	0,0848	0,0884	0,0805	

**Tabela 3.4.** Estimativas de diferenciação genética de Jost ( $D_{est}$ ) entre as populações amostrais I-PNR/2011, P-PNR/2011, T-PNR/2011 e T-PNR/2012.

População	I-PNR/2011	P-PNR/2011	T-PNR/2011	T-PNR/2012
I-PNR/2011				
P-PNR/2011	0,000			
T-PNR/2011	0,000	0,000		
T-PNR/2012	0,035	0,030	0,027	

De acordo com o teste de atribuição de indivíduos obtidos pelo GENALEX, um total de 41% dos indivíduos pertencentes a uma determinada população foi atribuído a outra, que não a sua previamente definida. Os resultados revelaram que apenas as populações amostrais do PNR 2011 foram atribuídas a outras populações diferentes daquelas definidas *a priori*. Para indivíduos amostrados em 2012 (T-PNR/2012), apenas um indivíduo foi atribuído a outra população, que não à sua previamente estipulada (Tabela 3.5).

**Tabela 3.5.** Sumário dos resultados de atribuição dos indivíduos de *S. brasiliensis*, obtidos através do programa GENALEX 5.1.

População amostral	Própria população	Outra população
I-PNR/2011	13	17
P-PNR/2011	10	16
T-PNR/2011	5	15
T-PNR/2012	42	1
Total	70	49
Porcentagem	59%	41%

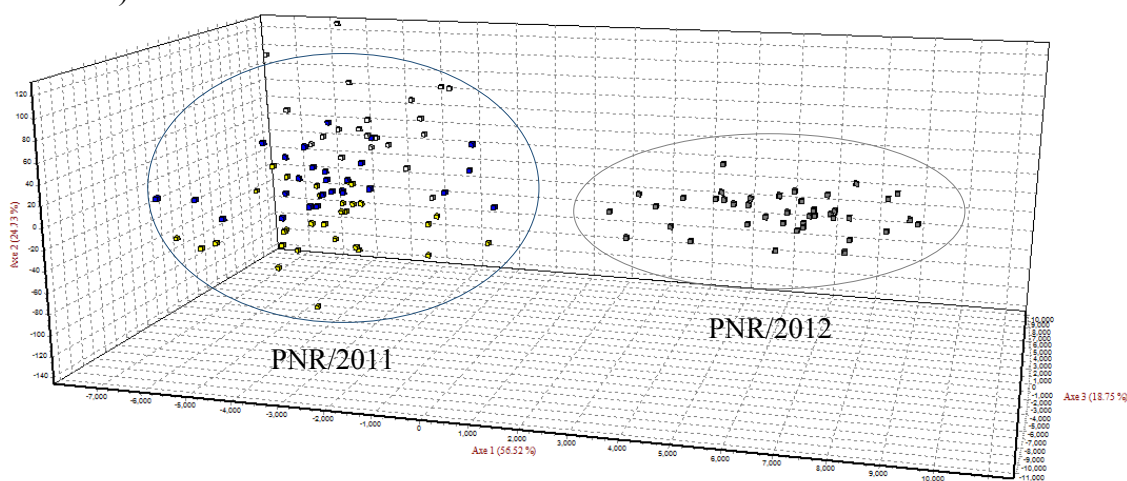
Os resultados da análise da variância molecular (AMOVA) (Tabela 3.6) mostraram concordância com os resultados de diferenciação genética. A AMOVA detectou que 3,28% da variabilidade genética encontra-se dividida entre os quatro grupos analisados.

**Tabela 3.6.** Análises de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 2005) entre quatro populações amostrais de *S. brasiliensis* representantes do período não-reprodutivo. Os valores de  $p$  foram calculados a partir de um teste de permutação aleatória (20.000 repetições).

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação	Valor de $p$
Entre grupos amostrais	36,972	0,143	3,28	0,0016
Entre indivíduos dentro dos grupos amostrais	938,350	4,21	96,71	
Total	975,322	4,35		

O gráfico de análise de correspondência fatorial (FCA) (Figura 3.4) revelou a sobreposição dos indivíduos amostrados no período não-reprodutivo de 2011 e uma evidente separação dos indivíduos correspondentes ao ano de 2012 (T-PNR/2012), corroborando com os resultados da análise Bayesiana e com os valores de  $F_{ST}$  e  $D_{est}$ .

**Figura 3.4.** Gráfico da análise de correspondência fatorial (FCA) para indivíduos amostrados no período não-reprodutivo: População I-PNR/2011 (pontos em amarelo), P-PNR/2011 (pontos em azul), T-PNR/2011 (pontos em branco) e T-PNR/2012 (pontos em cinza).



Com base nos resultados obtidos pelas análises de estruturação genética, definimos a existência de duas populações, uma composta por indivíduos amostrados no PNR/2011 e outra por indivíduos pertencentes ao conjunto de peixes amostrados no PNR/2012. Os valores de  $F_{ST}$  e  $D_{est}$  entre as duas populações detectadas foram de 0,085 e 0,037, respectivamente (Tabela 3.7).

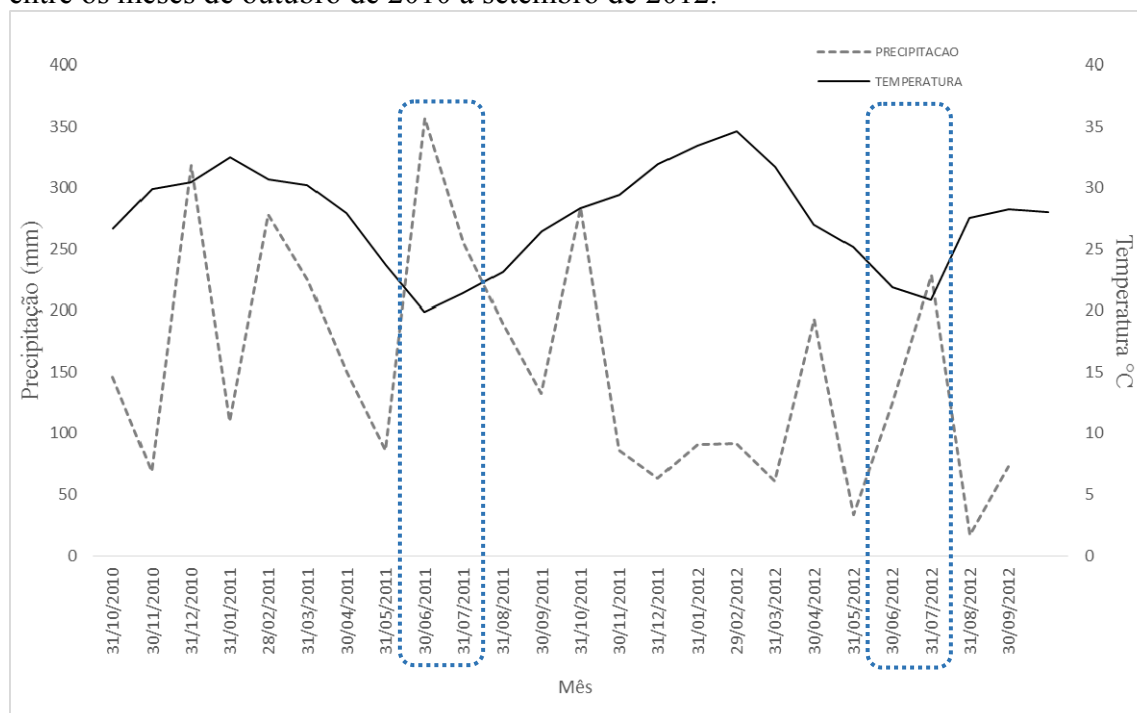


**Tabela 3.7.** Valores de  $F_{ST}$  (abaixo da diagonal)  $D_{est}$  (acima da diagonal) entre as populações de *S. brasiliensis* definidas após análises de estruturação genética. PNR (período não-reprodutivo). Valores significativos para  $p < 0,05$  (\*).

	PNR/2011	PNR/2012
PNR/2011		0,037
PNR/2012	0,085*	

Através do gráfico de parâmetros ambientais foi possível observar valores de temperatura similares para durante os dois períodos analisados, contudo, os valores de precipitação são diferenciados. No PNR/2011 o volume de chuvas registrado para o período estudado foi de 350 mm, superior ao mesmo período de 2012, que teve precipitação total menor que 250 mm (Figura 3.5).

**Figura 3.5.** Gráficos da variação mensal dos valores médios de precipitação (mm) e da temperatura (°C), na região do alto rio Uruguai-Brasil. (a) Resultados da variação média entre os meses de outubro de 2010 a setembro de 2012.



Fonte: Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa, do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

### 3.3 DISCUSSÃO

Encontramos diferenciação genética entre populações correspondentes a dois períodos não-reprodutivos e ausência de isolamento por distância para populações de *S. brasiliensis* na bacia do alto e médio rio Uruguai. Todas as populações amostrais de *S. brasiliensis* avaliadas no presente estudo apresentaram valores elevados de diversidade

genética. O número médio de alelos foi de 13 alelos por loco, superior a valores registrados para muitas espécies de peixes de água doce (HATANAKA *et al.*, 2006; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2008; ABREU *et al.*, 2009; SANCHES *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2013).

Os locos Sfra02, Sfra04 e Sfra15 não se apresentaram sob as expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com algumas populações amostrais exibindo déficits significativos de heterozigotos, ocorrência comumente detectada em populações naturais de peixes (HATANAKA *et al.*, 2006; NARUM *et al.*, 2006). Esses resultados podem ser explicados, dentre outros fatores, pela ocorrência de alelos nulos (GARCIA DE LEON *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2001). O loco Sfra15, especificamente, foi retirado das análises de estruturação populacional, por apresentar déficit de heterozigotos em todas as populações amostrais analisadas, sugerindo a presença de alelos nulos.

A compreensão de como as espécies de peixes migradores estão geneticamente organizadas é fundamental para a conservação dos recursos pesqueiros, além de ajudar a entender sua biologia (FRANKHAM *et al.*, 2008). O entendimento sobre o modo que os peixes migradores Neotropicais se organizam ainda é escasso, e um conceito que prevalece é que essas espécies se organizam em grandes populações panmíticas. Segundo Godoy (1975), as espécies migradoras apresentam hábitos “migratórios” e hábitos “residentes”, relacionados com atividades reprodutivas e de alimentação, respectivamente. Os hábitos migratórios ocorrem durante o período reprodutivo, quando os peixes iniciam a migração ascendente buscando ambientes adequados para a fertilização dos seus ovos (AGOSTINHO, 2007). Após a migração, os peixes iniciam a migração descendente, também chamada de migração trófica, rio abaixo, até iniciarem novo ciclo na próxima estação de desova. A forma de organização dos peixes entre as estações reprodutivas ainda permanece com poucas informações. Segundo Zaniboni-Filho e Schulz (2003), durante este período não-reprodutivo *S. brasiliensis* costuma exibir hábitos solitários formando pequenos cardumes.

A variação genética encontrada entre populações de *S. brasiliensis* amostradas em dois períodos não-reprodutivos foi detectada pela análise Bayesina, análises de distância ( $F_{ST}$ ) e estruturação genética ( $D_{est}$ ) e através do gráfico da análise de correspondência fatorial. A ocorrência de alelos exclusivos teve elevada frequência apenas na população T-PNR/2012. O elevado número de alelos privados identificado para a população do segundo período analisado e o resultado de atribuição de indivíduos

corroborar os resultados de estruturação genética no presente estudo. Sanches e Galetti Jr. (2007) e Rossini (2010) também identificaram diferenças genéticas significativas entre as populações amostrais da época não reprodutiva para *B. hiliarii* na sub-bacia do rio Miranda e *S. brasiliensis* da bacia do rio Mogi-Guaçu, respectivamente.

Os resultados encontrados contribuem para o crescente corpo de conhecimento sobre populações de peixes migradores que não se comportam como um modelo clássico de população panmítica, mas são formadas por populações que apresentam estruturação genética. Por habitarem o mesmo sistema hidrográfico e compartilharem os mesmos locais, existe a possibilidade de ocorrer algum fluxo gênico entre as populações. A estruturação populacional encontrada entre os dois períodos não-reprodutivos pode ser considerada baixa a moderada, similar a valores encontrados para diversas espécies migradoras marinhas (MCPHERSON *et al.* (2003), JØRGENSEN *et al.*, 2005b; MAES *et al.*, 2006; PAPA *et al.*, 2007; HAUSER; CARVALHO, 2008; KOVACH *et al.*, 2013). Essas diferenças sutis podem indicar mecanismos de estruturação genética importantes, que não devem ser negligenciadas (WRIGHT, 1978; WAPLES, 1998; JØRGENSEN *et al.*, 2005a). Estruturação genética em populações reprodutivas foi encontrada para diversas espécies migradoras Neotropicais (HATANAKA; GALETTI JR., 2003; HATANAKA *et al.*, 2006; ABREU *et al.*, 2009; SANCHES; GALETTI JR., 2012). Esses autores sugerem que as espécies migradoras sejam formadas por populações diferenciadas que habitam os mesmos sistemas hidrográficos, coexistindo de modo a manter agrupamentos reprodutivos geneticamente diferenciadas.

Para populações amostrais de *S. brasiliensis* correspondentes ao período reprodutivo na bacia do médio e alto no rio Uruguai, foi possível identificar estruturação genética temporal, também chamada de *isolation-by-time* (Capítulo 2). Espécies que apresentam este mecanismo são formadas por indivíduos que se reproduzem em diferentes momentos durante uma única temporada de desova (HENDRY *et al.*, 1999; HENDRY; DAY, 2005). Este padrão de estruturação durante o período reprodutivo é, provavelmente, resultado de cardumes de desova que se comportam como unidades genéticas distintas (SANCHES; GALETTI JR., 2012). Os resultados do presente estudo não corroboram com a hipótese testada e são mais difíceis de interpretar, pois se sabe muito pouco sobre a história de vida de peixes migradores e praticamente não existem estudos sobre o comportamento dessas espécies durante o período não-reprodutivo.

Contudo, se o movimento de migração reprodutiva dos peixes está diretamente associado a picos de chuvas, esta condição também poderia estar influenciando a sua movimentação durante o período não-reprodutivo, estimulando as populações a dispersar para ocuparem diferentes áreas de alimentação, não exibindo deste modo, fidelidade por determinados locais.

Estudando o movimento de *S. brasiliensis* na bacia do alto e médio rio Uruguai, Hahn (2011) verificou, através de resultados de biotelemetria, a presença de populações estacionadas por períodos prolongados no trecho a jusante da barragem UHE Itá. Utilizando a mesma técnica, Schütz *et al.* (2008) constataram que *S. brasiliensis* utilizam a região do alto rio Uruguai, compreendida entre o Parque Estadual do Turvo e a UHE Itá, durante todo o ano. Esses autores atribuem a permanência dos peixes nesta área, devido a presença de vários tributários que favorecem maior disponibilidade de alimento. Além disso, a região do Parque Estadual do Turvo pode se apresentar como um abrigo para os peixes, resultante da presença de mata ciliar abundante e menor pressão de pesca. Similar aos achados para populações de *S. brasiliensis* durante o período reprodutivo (Capítulo 2), os peixes amostrados fora dessa época não apresentaram estruturação espacial na região estudada. Através do gráfico da análise de correspondência fatorial é possível visualizar a sobreposição dos indivíduos do PNR/2011. O local de estudo abrange uma ampla extensão e não se apresentou como uma barreira de isolamento diante da capacidade migratória de *S. brasiliensis*. A capacidade de migração do dourado é indiscutível, sendo relatados movimentos diários maiores que 50 km (HAHN *et al.*, 2011) e distâncias superiores a 1000 km (PETRERE, 1985). A capacidade de dispersão pode ser a causa mais provável de ausência de isolamento por distância para *S. brasiliensis* na bacia do alto e médio rio Uruguai.

Podemos concluir que existe diferenciação entre peixes coletados no período não-reprodutivo, porém a diferenciação é temporal, resultante de peixes amostrados em anos distintos. Algumas suposições podem explicar esses resultados, como o fato de que populações de *S. brasiliensis* possam ocupar diferentes áreas ao longo do rio e não apresentarem fidelidade por áreas de alimentação.

**IMPACTOS DOS BARRAMENTOS  
HIDRELÉTRICOS SOBRE A DIVERSIDADE  
GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO  
POPULACIONAL DE DOURADO (*Salminus  
brasilensis*) NA BACIA DO ALTO RIO  
URUGUAI**



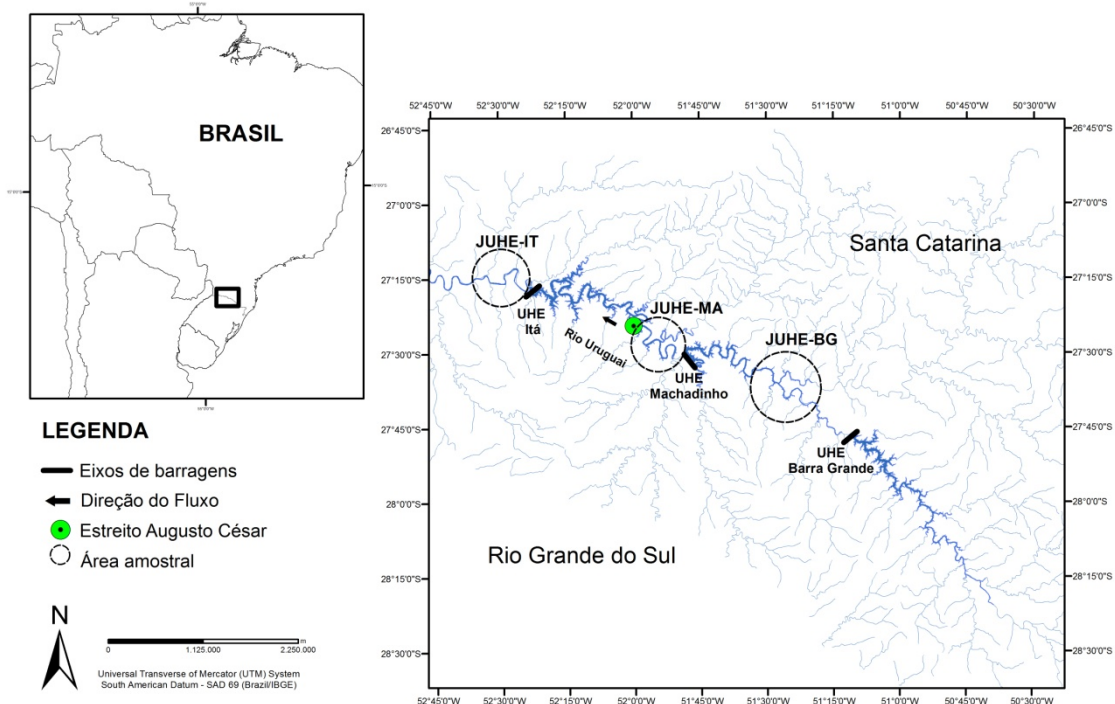
## 4. Impactos dos barramentos hidrelétricos sobre a diversidade genética e estruturação populacional de dourado (*Salminus brasiliensis*) na bacia do alto rio Uruguai

### 4.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1.1 Amostragem

As coletas dos indivíduos foram realizadas em três regiões amostrais fragmentadas por barramentos hidrelétricos na bacia do alto rio Uruguai: a jusante da UHE Barra Grande (JUHE-BG), entre os anos de 2003-2012; a montante da UHE Itá até a Jusante da UHE Machadinho (JUHE-MA), entre 2006-2011; e a Jusante da UHE Itá (JUHE-IT), entre os anos de 2010 e 2011. A localização sobre a área de estudo pode ser visualizada na Figura 4.1.

**Figura 4.1.** Locais de coleta de *S. brasiliensis* na bacia do alto rio Uruguai, divisa entre os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil.



Fonte: LAPAD/UFSC.

Foram amostrados um total de 12 indivíduos em JUHE-BG, 29 em JUHE-MA e 31 em JUHE-IT. Os peixes foram amostrados através espinhéis de fundo, redes de emalhe e molinete, com auxílio do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), da Universidade Federal de Santa Catarina. Após a retirada de um

pequeno fragmento da nadadeira caudal (aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>), os peixes que se encontravam vivos foram soltos novamente no rio. Todas as amostras de tecido foram imediatamente preservadas em álcool absoluto e posteriormente armazenadas em freezer (-20°C). Detalhes da data de coleta de cada uma das amostras das três populações amostrais podem ser visualizados no Apêndice 1.

#### 4.1.2 Extração do DNA e amplificação dos locos de microssatélites

O DNA genômico dos indivíduos foi extraído a partir de um fragmento de nadadeira utilizando-se o procedimento de Aljanabi e Martinez (1997). A integridade do DNA obtido foi avaliada através eletroforese em gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e a concentração do DNA foi obtida em biofotômetro. Foram utilizados 11 *primers* heterólogos de microssatélites para caracterizar as populações: Sfra02, Sfra10, Sfra13, Sfra03, Sfra04, Sfra18, Sfra14, Sh5 e BoM2 (detalhes no anexo 2).

As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 10µl contendo 30ng de DNA molde, 1X de *GoTaq® Colorless Master Mix 2X* (Promega), 8 pmol do iniciador M13 com fluorescência (FAM, TET ou HEX), 8pmol do iniciador *forward*; 2pmol do iniciador *reverse* (com a sequência da cauda M13). Os programas de amplificação seguiram o seguinte padrão: 5 minutos a 94°C seguidos por 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos na temperatura de anelamento específico de cada *primer*, 45 segundos a 72°C; 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C; e um ciclo final de 10 minutos a 72°C. As genotipagens foram realizadas em sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare Life Science) e a leitura dos alelos foi realizada através do programa *Fragment Profiler Software Suite v1.2* (GE Healthcare Life Science) com ET-ROX 550-R como tamanho padrão.

#### 4.1.3 Estimativa dos níveis de diversidade genética e estruturação populacional

O programa MICROCHECKER (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004) foi utilizado para verificar a presença de alelos nulos. O número de alelos (*A*) e os valores da heterozigosidade esperada (*He*) e observada (*Ho*) foram estimados através do programa GENALEX 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A estimativa da riqueza alélica (*Ra*) o índice de endocruzamento  $F_{IS}$  e os valores de *p*, para o excesso e para o déficit de heterozigotos, foram obtidos através do programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001). Testes para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, realizados usando o método

baseado em Cadeias de Markov (GUO; THOMPSON, 1992), e testes de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos foram realizados através do programa GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Correções para testes múltiplos foram feitas seguindo o procedimento de Bonferroni ( $k$ ) (RICE, 1989). Comparamos a  $He$  e a  $Ra$  entre as três populações amostrais utilizando ANOVA, através do programa BIOESTAT 5.8.4 (AYRES *et al.*, 2007), após a normalização dos valores para cada loco.

O programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000; FALUSH *et al.*, 2003) foi utilizado para determinar a estruturação genética populacional. A análise para determinar o número de populações foram realizadas sem informação *a priori* da origem dos indivíduos, com o modelo de mistura das populações, com a opção de frequências alélicas correlacionadas. Para cada valor de  $K$  (1 a 10) foram realizadas seis corridas independentes, e para cada uma delas foram realizadas 1.000.000 cadeias de Markov-Monte Carlo, após um período de corte inicial (*burn-in*) de 200.000 interações. O logaritmo da probabilidade dos dados  $\ln P(D/K)$  (PRITCHARD *et al.*, 2000) e as estimativas de DeltaK (EVANNO *et al.*, 2005) foram determinadas através do programa Structure Harvester (EARL, 2012).

Os valores par-a-par de  $F_{ST}$  (WEIR; COCKERHAM, 1984) entre as populações amostrais foram obtidos através do programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005), seguidas de correções para análises múltiplas, foram realizadas segundo o procedimento de Bonferroni ( $k$ ) (RICE, 1989). Estimativas de diferenciação genética de Jost ( $D_{est}$ ) par-a-par foram obtidas através do programa SMOGD v1.2.5 (CRAWFORD, 2010), com 1.000 réplicas de *bootstrap*. A análise da variância molecular (AMOVA) foi realizada no programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Realizamos a análise de correspondência multidimensional fatorial (FCA) através do programa GENETIX 4.02 (BELKHIR *et al.*, 2004), que permite a visualização dos indivíduos no espaço, pela projeção dos resultados de similaridade de seus alelos. O programa LDNe (WAPLES; DO, 2008) foi utilizado para calcular o tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) através do método JackKnife. A presença de sinais genéticos de redução do tamanho populacional foi verificada através do programa BOTTLENECK 1.2.02 (PIRY *et al.*, 1999). Assumiu-se o modelo misto de mutação de microssatélites (TPM), com 70% de mutação de passo simples e 30% de mutação de múltiplos passos (LUIKART; CORNUET, 1998).



## 4.2 RESULTADOS

### 4.2.1 Diversidade genética e estrutura populacional

A estimativa da diversidade genética para os indivíduos de *S. brasiliensis* foi realizada através de 11 locos de microssatélites. As análises foram realizadas considerando os 72 indivíduos, representantes das três populações amostrais. Não foram detectados sinais de desequilíbrio de ligação para nenhum dos pares de locos utilizados. Os locos Sfra02 e Sfra15 apresentaram déficit de heterozigotos na população JUHE-MA, e os locos Sfra13, Sfra14 e Sh56 na população JUHE-BG. Desvios significativos do EHW foram identificados nos locos Sfra14 e Sfra15 para a população amostral JUHE-BG e no Sfra14 para a população JUHE-MA (Tabela 4.1). Valores de  $F_{IS}$  significativos foram observados apenas para o loco Sfra14 na população amostral JUHE-BG. O número de alelos variou de sete (locos Sfra18 e BoM2) a 31 (loco Sfra02), nas populações amostrais JUHE-BG e JUHE-MA, respectivamente. A riqueza alélica ( $R_a$ ) variou de 5,1 a 13,8, com média de 6,8 para JUHE-BG, 6,7 para JUHE-MA e 7,05 na população JUHE-IT. As populações apresentaram uma  $H_o$  média de 0,828 e uma  $H_e$  média de 0,840, com valores variando de 0,500 a 1,000 e 0,686 a 0,962, respectivamente (Tabela 4.1). As estimativas de heterozigosidade esperada e riqueza alélica não foram diferentes entre as três populações amostrais analisadas (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

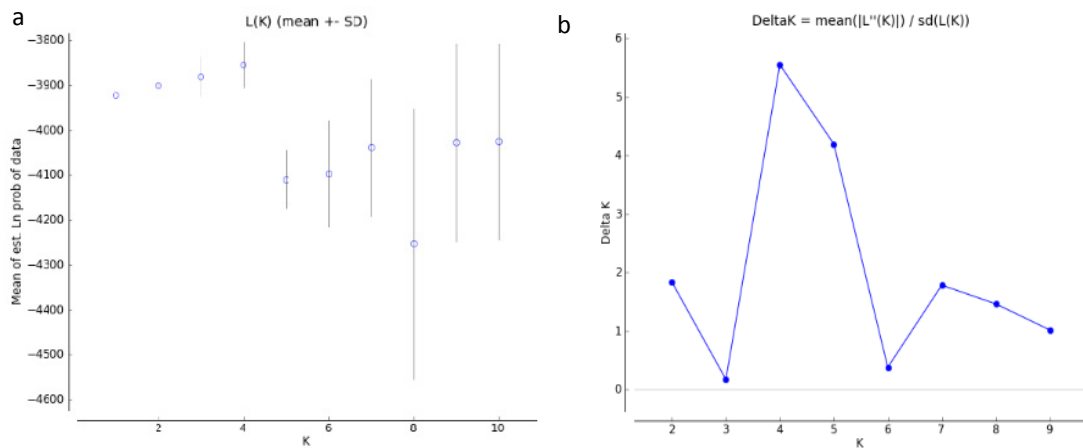
O tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) dos indivíduos amostrados em JUHE-BG foram negativos devido ao pequeno tamanho amostral da população. O  $N_e$  para a população JUHE-MA foi de 98,8 (CI: 48-174) ( $p < 0,05$ ) e de 148 (CI: 70-170) ( $p < 0,05$ ) indivíduos para a população JUHE-IT. Não foram verificados indícios de gargalo populacional recente.

**Tabela 4.1.** Parâmetros de variação genética nas populações amostrais de *S. brasiliensis* da bacia do alto rio Uruguai, baseados em 11 locos de microssatélites. Número de indivíduos ( $N$ ); número de alelos ( $A$ ); riqueza alélica ( $Ra$ ); heterozigosidade observada ( $Ho$ ); heterozigosidade esperada ( $He$ ); coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Valores significativos para  $F_{IS}$  se apresentam com asterisco ( $p= 0,001$ ); valores de  $p$  significativos para o desvio EHW estão em negrito, e valores em itálico indicam a presença de alelos nulos. Nível de significância ajustado para comparações múltiplas ( $p= 0,0045$ ).

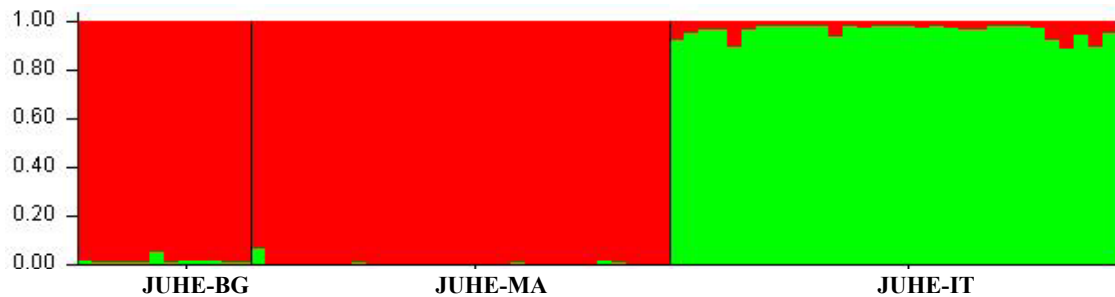
10.8	Locos de microssatélites											
	Sfra02	Sfra10	Sfra13	Sfra03	Sfra04	Sfra18	Sfra05	Sfra14	Sfra15	BoM2	Sh56	Média
	<b>JUHE-BG</b>											
$N$	10	9	12	10	12	12	11	8	11	12	9	11
$A$	12	8	12	8	8	7	8	11	13	7	8	8
$Ra$	10,7	7,6	9,4	7,2	6	6	7,2	11	10,4	6,2	7,7	7,6
$Ho$	1,000	0,667	0,667	0,700	0,667	0,500	1,000	0,625	0,909	1,000	0,556	0,667
$He$	0,900	0,840	0,854	0,805	0,694	0,698	0,798	0,875	0,880	0,799	0,840	0,84
$F_{IS}$	-0,059	0,262	0,261	0,182	0,083	0,323	-0,209	0,346*	0,015	-0,211	0,389	0,132
$P_{EHW}$	0,591	0,211	0,035	0,296	0,438	0,049	0,290	<b>0,003</b>	0,031	0,182	0,010	0,182
	<b>JUHE-MA</b>											
$N$	26	29	29	27	29	26	28	28	27	29	26	28
$A$	31	16	21	11	7	10	9	21	15	7	10	11
$Ra$	13,8	9,5	11,4	6,6	5,3	6,7	6,2	11,3	8,6	5,1	6,5	6,7
$Ho$	0,885	0,828	0,862	0,852	0,759	0,692	0,750	0,857	0,667	0,759	0,885	0,828
$He$	0,962	0,903	0,937	0,791	0,718	0,823	0,807	0,933	0,873	0,764	0,812	0,823
$F_{IS}$	0,100	0,101	0,097	-0,058	-0,039	0,178	0,089+	0,099	0,254	0,025	-0,070	0,097
$P_{EHW}$	0,010	0,020	0,014	0,149	0,202	0,056	<b>0,295</b>	<b>0,002</b>	0,000	0,232	0,284	0,056
	<b>JUHE-IT</b>											
$N$	30	31	31	31	31	30	31	30	31	31	31	31
$A$	28	10	25	15	9	9	11	16	28	9	12	12
$Ra$	12,6	7	12,1	8,1	6,8	5,5	6,6	9,2	12,6	6,7	7,1	7,1
$Ho$	0,933	0,742	0,968	0,935	0,871	0,533	0,710	0,967	0,871	0,774	0,871	0,871
$He$	0,949	0,846	0,944	0,842	0,834	0,686	0,776	0,899	0,950	0,829	0,835	0,842
$F_{IS}$	0,034	0,139	-0,009	-0,095	-0,029	0,238	0,102	-0,059	0,099	0,082	-0,027	0,034
$P_{EHW}$	0,306	0,330	0,946	0,735	0,015	0,009	0,151	0,308	0,033	0,171	0,082	0,171

Após as estimativas de diversidade genética realizamos as análises para verificar a existência de estruturação genética para *S. brasiliensis*. A abordagem Bayesiana, realizada através programa STRUCTURE foi utilizada para determinar o número de populações em ausência de informação geográfica. A probabilidade posterior dos dados [LnP(D)] indicou o número mais provável de populações  $K=2$  (Figura 4.2). A distribuição das probabilidades individuais de atribuição de genótipos pode ser visualizada no gráfico de estrutura *bar plot* (Figura 4.3).

**Figura 4.2.** (a) Resultados das estimativas de Ln(P(X/K) versus o número de populações (K), analisados através do programa Structure 3.3. (b) Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno *et al.* (2005).



**Figura 4.3.** Probabilidades de atribuição de indivíduos de *S. brasiliensis* para  $K=2$ .



Os resultados par-a-par de  $F_{ST}$ , assim como o resultado da análise Bayesina, não indicaram distância genética significativa entre os indivíduos de JUHE-BG e JUHE-MA ( $F_{ST}= 0,001$ ,  $p= 0,495$ ) (Tabela 4.2). Em contrapartida, os indivíduos amostrados em JUHE-IT apresentaram distância genética altamente significativa em relação aos demais indivíduos ( $F_{ST}= 0,05$ ,  $p=0,000$ ) (Tabela 4.2). A análise de diferenciação genética  $D_{est}$  também apresentou maiores valores entre os indivíduos amostrados em JUHE-BG e

JUHE-IT (0,050), e entre JUHE-BG e JUHE-IT (0,057). Não houve diferenciação entre a população amostral JUHE-BG e JUHE-MA (0,001) (Tabela 4.3). O gráfico de análise de correspondência fatorial obtido pelo programa GENETIX revelou uma clara separação entre os indivíduos amostrados em JUHE-IT e os demais (Figura 4.4). A AMOVA confirmou estruturação genética significativa, com 3,88% da variabilidade genética entre as populações analisadas (Tabela 4.4).

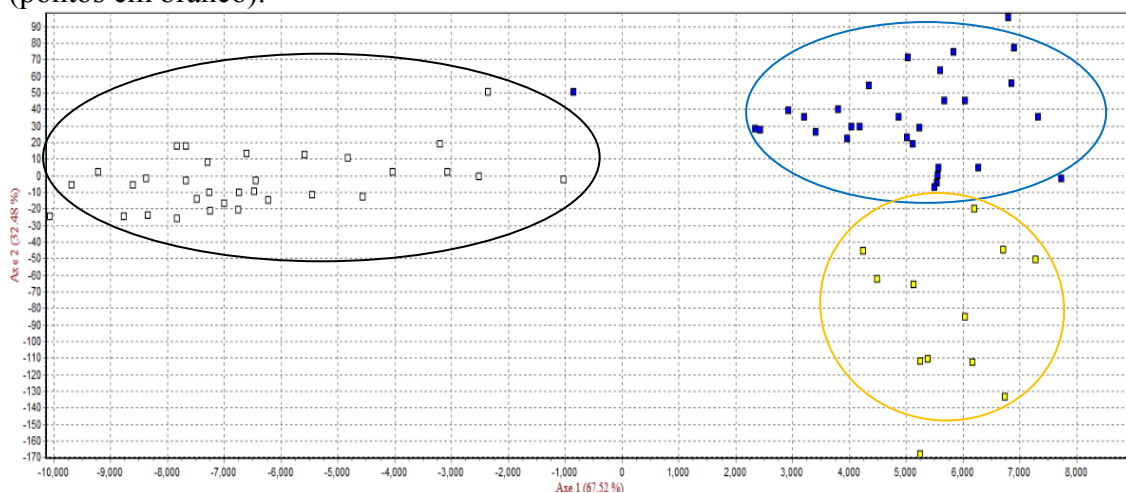
**Tabela 4.2.** Valores de  $F_{ST}$  par-a-par (abaixo da diagonal) e  $p$  (acima) entre as populações amostrais JUHE-BG, JUHE-MA e JUHE-IT da bacia do alto rio Uruguai, Brasil. Valores significativos para  $p < 0,05$  (\*) e nível ajustado para comparações múltiplas ( $p = 0,017$ ) (\*\*).

População	JUHE-BG	JUHE-MA	JUHE-IT
JUHE-BG	-	0,495	0,0000**
JUHE-MA	0,001	-	0,0000**
JUHE-IT	0,050	0,057	-

**Tabela 4.3.** Estimativas de diferenciação genética de Jost ( $D_{est}$ ) entre as populações amostrais JUHE-BG, JUHE-MA e JUHE-IT.

População	JUHE-BG	JUHE-MA	JUHE-IT
JUHE-BG			
JUHE-MA	0,003		
JUHE-IT	0,214	0,155	

**Figura 4.4.** Gráfico de análise de correspondência fatorial (FCA) para as populações amostrais JUHE-BG (pontos em amarelo), JUHE-MA (pontos em azul) e JUHE-IT (pontos em branco).



**Tabela 4.4.** Análises de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 2005) entre as populações amostrais JUHE-BG, JUHE-MA e JUHE-IT.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação	Valor de <i>p</i>
Entre populações	26,173	0,1922	3,881	0,0125
Dentro das populações	640,215	4,7551	96,112	
Total	666,388	4,9420		

### 4.3 DISCUSSÃO

Este estudo aborda o efeito das fragmentações resultante da construção de usinas hidrelétricas sobre as populações de *S. brasiliensis* na bacia do alto rio Uruguai. Identificamos a existência de duas populações geneticamente diferenciadas entre indivíduos amostrados a montante e a jusante da UHE Itá. Os níveis de variabilidade genética, como o número médio de alelos por loco e os níveis de heterozigosidade apresentaram valores similares aos encontrados para peixes de água doce (SIVASUNDAR *et al.*, 2001; HATANAKA *et al.*, 2006; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2008; SANCHES *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2013). Mesmo para a população JUHE-BG, com o menor número amostral, o número médio de alelos foi oito, valor próximo à média encontrada em peixes de água doce, de 9,1 alelos por loco (DEWOODY; AVISE, 2000).

Os resultados do presente trabalho não corroboram com a hipótese de redução da variação genética a montante dos barramentos. A diversidade genética, medida através da riqueza alélica e heterozigosidade esperada, não apresentou diferenças significativas entre as populações amostrais analisadas. Estes resultados se devem, provavelmente, ao pouco tempo de existência das barragens, porém, o cenário para a bacia é da implantação de futuros empreendimentos. A construção de barramentos impõe um fluxo gênico unidirecional, e este fator tem sido proposto como a principal causa de redução da diversidade em populações de *Gambusia hoibrooki* amostradas a montante, em comparação a populações a jusante da barragem (HERNANDEZ-MARTICH; SMITH, 1997). Além disso, a alteração do ambiente e a redução da capacidade de carga pode reduzir a diversidade genética em populações situadas a montante de barramentos (YAMAMOTO *et al.*, 2004).

As usinas hidrelétricas do alto rio Uruguai não possuem sistema de transposição de peixes, portanto, se ocorre algum fluxo gênico este é unidirecional, e por este motivo

espera-se que todos os valores de diversidade sejam menores nas populações localizadas a montante. No entanto, os valores de riqueza alélica não diferiram entre as três populações amostrais estudadas, indicando que as mesmas ainda não estão profundamente afetadas pelos barramentos. A barragem hidrelétrica mais antiga construída no alto rio Uruguai é a UHE Itá, que entrou em operação no ano de 2000. Este período de isolamento ainda é muito curto, considerando que para peixes, sinais genéticos provenientes de fragmentações antropogênicas podem ser detectados em períodos de 60 anos (BESSERT; ORTÍ, 2008). Yamamoto *et al.* (2004) encontraram diferenças significativas entre populações situadas a montante e a jusante de barramentos isoladas há mais de 30 anos. Estudo realizado por Ramella *et al.* (2006) encontrou elevados valores de variabilidade genética para indivíduos de *S. brasiliensis* no alto rio Uruguai, através de marcadores RAPD. Este mesmo padrão foi observado para populações de *S. brasiliensis* da bacia do rio Mogi-Guaçu (ROSSINI, 2010), e para indivíduos de *S. hilarii* no alto rio São Francisco (NUNES, 2010), ambos analisados através de marcadores tipo microsatélites.

A elevada diversidade genética somada ao pouco tempo de existência dos barramentos podem explicar ausência de gargalo populacional recente. Contudo, a estimativa de tamanho populacional efetivo foi menor para a população amostrada a montante da UHE Itá (população JUHE-MA) em comparação com aqueles amostrados a jusante da barragem (JUHE-IT). Embora os parâmetros de diversidade genética sejam similares entre as populações amostrais estudadas, a redução do tamanho populacional é refletida pelo baixo número de amostras na população JUHE-BG, que se localiza na porção mais superior do alto rio Uruguai. Mesmo com coletas intensivas, o tamanho amostral foi baixo, o que pode estar causando um desvio no resultado das análises, além de impedir a estimativa do tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ). Para as populações amostrais JUHE-MA e JUHE-IT o cálculo de tamanho populacional efetivo foi baixo (98,8 e 148, respectivamente). A presença de barragens hidrelétricas impede o acesso de novos indivíduos às populações localizadas a montante da UHE Itá, e esta perturbação irá provavelmente resultar em redução dos tamanhos efetivos populacionais, perda de conectividade e redução da diversidade genética (NEI *et al.*, 1975; JAGER *et al.*, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 2004). Valores de tamanhos populacionais efetivos maiores que 500 indivíduos têm sido geralmente aplicados como critérios para a determinação do estado de conservação entre os táxons (MACE; LANDE 1991), contudo ainda sabe-se

pouco sobre o tamanho populacional mínimo para a manutenção de populações naturais de peixes.

Os efeitos negativos das fragmentações sobre a reprodução de espécies de peixes são muito discutidos (NERAAS; SPRUELL 2001, AGOSTINHO *et al.*, 2007; REID *et al.* 2008, ESGUÍCERO; ARCIFA, 2010). A descoberta de uma área de desova de *S. brasiliensis* na região entre a UHE Itá e a UHE Machadinho pode ser um fator positivo para o sucesso da manutenção das espécies neste trecho localizado entre esses barramentos (REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2012). Apesar disso, deve-se levar em consideração que as populações amostrais de *S. brasiliensis* encontram-se fragmentadas em trechos entre reservatórios, com redução de área de vida, suscetíveis a pesca e com áreas reduzidas para sua migração. Populações com tamanhos efetivos continuamente pequenos tornam-se notadamente suscetíveis à perda da variação genética por deriva, ou flutuações ocasionais, como gargalos populacionais ou evento fundador (ELLSTRAND; ELAM, 1993), comprometendo a expectativa de manutenção dessas populações (JAGER *et al.*, 2001).

Os fatores que afetam a diferenciação genética entre populações incluem o fluxo gênico, o tamanho populacional efetivo, a mutação, a seleção e a deriva genética (WRIGHT, 1978). Peixes migradores, como *S. brasiliensis* podem percorrer centenas de quilômetros durante o período reprodutivo, e são capazes de transpor barreiras geográficas através de seus saltos, porém, barramentos hidrelétricos são intransponíveis para movimentos no sentido jusante-montante. A abordagem Bayesiana, a qual indicou a existência de duas populações também permitiu a clara separação entre os indivíduos amostrados a montante e a jusante da UHE Itá. Os resultados obtidos pelo STRUCTURE mostram uma tendência de um número maior de populações, fato que pode estar associado a presença de peixes representantes de diversas populações. Como discutido no CAPÍTULO 2, as populações de *S. brasiliensis* na bacia do alto e médio rio Uruguai se diferem temporalmente. Como os indivíduos amostrados no presente trabalho foram amostrados em diferentes momentos do período reprodutivo e não-reprodutivo, as populações amostrais podem estar representando diferentes grupos genéticos. Mesmo com essa possibilidade foi possível identificar grupos geneticamente distintos localizados a jusante e a montante da UHE Itá. Os resultados de  $F_{ST}$  também revelaram a existência de distância genética significativa entre os indivíduos amostrados em

JUHE-IT em comparação com os demais, resultados que também são corroborados pela diferenciação genética de Jost.

Estudos de composição ictiofaunística realizados anteriormente à construção dos barramentos revelaram que peixes amostrados em pontos correspondentes a área a jusante da UHE Itá compunham uma assembleia de peixes diferenciada em relação a indivíduos amostrados na região a montante, que atualmente corresponde a JUHE-MA (MEURER, 2010). Essa diferenciação se deve, provavelmente, a presença de um cânion conhecido com Estreito Augusto César Gorge, que foi inundado pelo reservatório de Itá. Durante períodos de estiagem o referido cânion se constituía como um obstáculo natural responsável pela diferenciação de assembleias de peixes e, provavelmente, também poderia ter sido responsável pela diferenciação das populações de *S. brasiliensis*. Como o Estreito foi inundado pela formação do reservatório de Itá, a diferenciação das populações irá se manter devido a presença da própria UHE Itá. Diferente do observado em JUHE-IT, não foram encontradas evidências de diferenciação genética entre os indivíduos amostrados em JUHE-MA e JUHE-BG. Pôde-se apenas observar uma distribuição espacial, evidenciada pela correspondência fatorial que revelou maior similaridade entre os indivíduos de JUHE-MA e JUHE-BG, e maior separação entre os indivíduos da população JUHE-IT. Entretanto, devido a presença da UHE Machadinho, as populações amostrais JUHE-MA e JUHE-BG tendem a se diferenciar ao longo do tempo devido ao fluxo restrito de genes entre elas (KIMURA; CROW, 1963).

A AMOVA detectou variação significativa entre as populações, apesar de encontrar maior variação entre indivíduos dentro das populações do que entre elas. O tempo de fragmentação entre os três trechos estudados é curto, e por este motivo a estruturação identificada pode ser consequência da existência da barreira natural proporcionada pelo cânion. Trabalhos de estruturação populacional em regiões fragmentadas por barragens hidrelétricas não verificaram diferenciação devido aos barramentos (GARCEZ *et al.*, 2011), mesmo para população isoladas por um período de tempo muito maior do que o ocorrido no alto rio Uruguai. Diversos trabalhos encontraram sinais de diferenciação genética resultantes de barreiras antropogênicas somente depois de várias gerações de separação (BESSERT; ORTÍ, 2008; GARCEZ *et al.*, 2011; BARROCA *et al.*, 2012). Segundo Hernandez-Martich e Smith (1997), a deriva genética e a seleção podem ser os fatores mais importantes para diferenciação genética observada entre montante/jusante.



Os resultados permitem concluir através da análise molecular das três populações amostrais que existem duas populações geneticamente estruturadas. As populações amostrais JUHE-MA e JUHE-BG constituem em uma única população, que se diferencia geneticamente da população JUHE-IT. A população formada pelos indivíduos amostrados em JUHE-MA e JUHE-BG encontra-se atualmente fragmentada pela barragem UHE Barra grande. Apesar da presença das usinas hidrelétricas, as populações apresentaram valores elevados de diversidade genética, porém com baixo valor de tamanho populacional efetivo.

Os resultados encontrados no presente trabalho devem ser levados em consideração para medidas de conservação, pois como o tamanho efetivo populacional está muito baixo a montante da UHE Machadinho e Barra Grande, o rio Ligeiro deve ser considerado como área prioritária de conservação, pois ocorrem desovas de peixes migradores nessa área. Além disso, como a Usina de Machadinho está fragmentando uma população, se forem realizado repovoamento de *S. brasiliensis*, esses peixes devem ser oriundos de reprodutores da região que compreende a área a montante e a jusante da UHE Machadinho. Já a população a jusante da UHE Itá deve ser tratada como uma população diferente geneticamente da população a montante da referida usina hidrelétrica.

**SISTEMA DE ACASALAMENTO DE  
*Salminus brasiliensis* INFERIDO A PARTIR  
DA RECONSTRUÇÃO DE PARENTESCO  
BASEADO EM LARVAS OBTIDAS DE UMA  
DESOVA NATURAL**



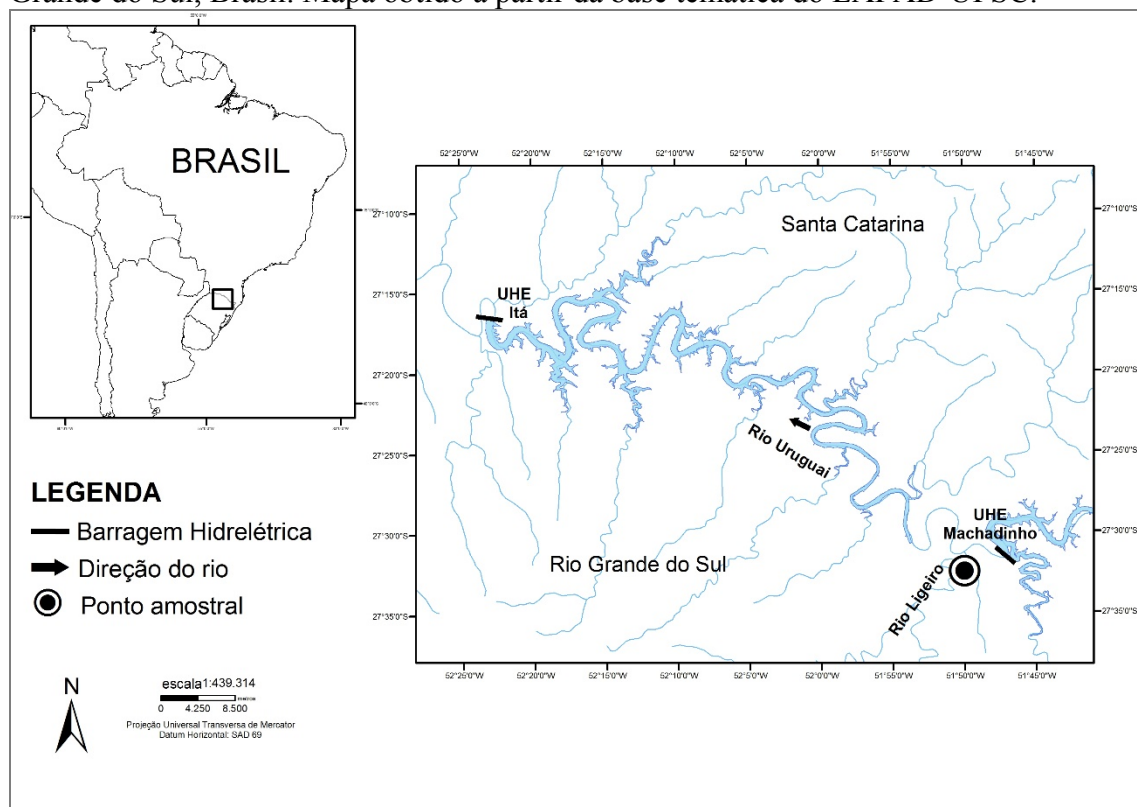
## 5. Sistema de acasalamento de *Salminus brasiliensis* inferido a partir da reconstrução de parentesco baseado em larvas obtidas de uma desova natural

### 5.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.1.1 Área de estudo e amostragem das progênies

Este estudo foi realizado na bacia do alto rio Uruguai, na foz do rio Ligeiro (27°31' S; 51°50' W), localizado entre os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, na região Sul do Brasil. O rio Ligeiro é o único tributário situado entre as UHEs Itá e Machadinho que deságua em um trecho lótico entre essas duas barragens hidrelétricas (Figura 5.1).

**Figura 5.1.** Localização da área de estudo na bacia do alto rio Uruguai, em um trecho situado entre as UHEs Itá e Machadinho, divisa entre os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil. Mapa obtido a partir da base temática do LAPAD-UFSC.



Os ovos foram amostrados no mês de janeiro de 2010 às 21:00 h, utilizando duas redes de plâncton cônico-cilíndricas (0,5 mm de malha e área de entrada de 0,11 m<sup>2</sup>) com um fluxômetro acoplado em cada uma das redes. A amostragem foi realizada na

superfície da água, com auxílio de barco, em um arrasto em baixa velocidade por 10 minutos (HERMES-SILVA *et al.*, 2009). As amostras de ovos coletadas foram imediatamente incubadas em sacos plásticos contendo água e oxigênio. A triagem, identificação da espécie e determinação do estágio embrionário de desenvolvimento foram realizados em microscópio estereoscópio por ictiologista especialista (NAKATANI *et al.*, 2001; REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO, 2008). Após a incubação, as larvas eclodidas e identificadas como *S. brasiliensis* foram preservadas em etanol 96%.

### 5.1.2 Extração do DNA e amplificação dos locos de microssatélites

O DNA total das larvas foi obtido seguindo o método de extração com tampão salino (ALJANABI; MARTINEZ, 1997) (detalhes Anexo 1). A técnica de DNA *Barcode* foi empregada para a identificação molecular da espécie (HEBERT *et al.*, 2003). Amostras de quatro larvas foram escolhidas ao acaso e utilizadas para a amplificação de um fragmento do gene mitocondrial da subunidade I da citocromo c oxidase (COI).

Amplificações através da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram conduzidas utilizando os *primers* LCO1490 e HCO2198 descritos por Folmer *et al.* (1994). Os produtos da PCR foram purificados através de precipitação em PEG 8000 (polietilenoglicol 20% e NaCl 2.5 M) (DUNN; BLATTNER, 1987) e dissolvidos em água Milli-Q. O sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia), e as sequências foram analisadas e editadas com o programa de alinhamento BioEdit Editor v. 5.0.9 (HALL, 1999). Árvores de distância foram construídas através do método Neighbor-Joining e com o modelo Kimura 2-parâmetros no MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). Sequências COI de exemplares adultos de *S. brasiliensis* foram utilizadas como referência, e sequências COI de *S. hilarii*, *S. affinis* e *S. franciscanus* foram utilizados como grupos externos.

Um total de 41 larvas foram genotipadas utilizando sete locos microssatélites desenvolvidos para *S. franciscanus*: Sfra02, Sfra03, Sfra04, Sfra10, Sfra13, Sfra14, Sfra18 (ROSSINI *et al.*, 2010), e um loco desenvolvido para *S. hilarii*: Sh05 (SILVA; HILSDORF, 2011) (detalhes dos *primers* no Anexo 2). As reações de amplificação foram realizadas com marcação fluorescente M13 (SCHUELKE, 2000), para um volume final de 10µl contendo: 20–50ng de DNA molde; 1X de *GoTaq® Colorless*

*Master Mix 2X* (Promega); 8pmol do iniciador M13 com FAM, TET ou HEX label; 8pmol do iniciador *forward*; 2pmol do iniciador *reverse* (com a sequência da cauda M13). Os programas de amplificação seguiram o seguinte padrão: 5 minutos a 94°C seguidos por 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos na temperatura de anelamento (ROSSINI *et al.*, 2010; SILVA; HILSDORF, 2011), 45 segundos a 72°C; 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C; e um ciclo final de 10 minutos a 72°C. As genotipagens foram realizadas em sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare Life Science) e a leitura dos alelos foi realizada através do programa *Fragment Profiler Software Suite v1.2* (GE Healthcare Life Science) com ET-ROX 550-R como tamanho padrão.

### 5.1.3 Análise estatística dos dados

A ocorrência de alelos nulos e a presença de picos não específicos foram verificadas através do programa MICROCHECKER v.2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). O número de alelos por loco ( $A$ ), número efetivo de alelos por loco ( $A_e$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) foram calculadas com o programa GENALEX v.6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). O programa Genepop v.1.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995) foi utilizado pra testar o possível desvio do Equilíbrio de Ligação e testes de desvios do Equilíbrio Hardy-Weinberg. O coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi calculado através do programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). A Probabilidade de Exclusão ( $PE$ ) e a Probabilidade de Identidade ( $PI$ ) foram calculadas pelo GENALEX v6.4. O tamanho populacional efetivo  $N_e$  (WRIGHT, 1931) proposto por Wang (2009), bem como o número de possíveis parentais das 41 larvas foram estimados através da abordagem de verossimilhança do programa COLONY 2.0 (JONES; WANG, 2010), com os seguintes parâmetros: número desconhecido de parentais, corrida muito longa, frequências alélicas conhecidas (uma amostra diferente, com 53 indivíduos, referente ao mesma área de estudo foi utilizada para estimar a frequência alélica) e diferentes estratégias de acasalamento (poligamia em ambos os sexos; monogamia em fêmeas e poligamia em machos; monogamia em machos e poligamia em fêmeas). O  $N_e$  também foi estimado através do programa LDNe (WAPLES; DO, 2008).

Para obtermos uma maior acurácia sobre o parentesco genético entre as larvas foram utilizadas três abordagens diferentes: i) cálculo do estimador de parentesco

imparcial  $r$  Queller e Goodnight (1989) (aqui denominado Q&Gr), através do programa KINGROUP (KONOVALOV *et al.*, 2004). Os valores de  $r$  foram avaliados através do método proposto por Blouin *et al.* (1996), com os valores de corte específicos para cada categoria de relacionamento: não-relacionados (UR), meios-irmãos (HS) e irmãos-completos (FS); ii) simulações com base nos dados genotípicos, para identificar as supostas relações de parentesco, por meio do programa ML-RELATE (KALINOWSKI *et al.*, 2006).

O programa ML-RELATE também foi utilizado para teste de hipóteses, testando, hipótese nula (H0), uma relação de FS ou de HS, contra uma hipótese alternativa (H1) de UR. Os testes de hipóteses foram realizados com 10.000 aleatorizações, e iii) identificação da relação de parentesco (UR, HS ou FS) entre os pares de larvas, com base em seus genótipos, através do programa COLONY 2.0 (JONES; WANG, 2010). Estas abordagens metodológicas foram combinadas para atingir um nível conservador de atribuição de parentesco (MIÑO *et al.*, 2011). A classificação final da categoria de relacionamento entre pares de larvas foi estipulada quando houve congruência entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos utilizados nesta abordagem (MIÑO *et al.*, 2011).

## 5.2 RESULTADOS

Através do gene mitocondrial COI confirmou-se que as larvas amostradas pertenciam a espécie *S. brasiliensis*. As sequências foram depositadas no GeneBank, com os números de acesso KKF731764 - KF731768. Os oito locos de microssatélites utilizados foram polimórficos e o resumo dos resultados está descrito na Tabela 5.1. Somente o loco Sfra10 mostrou desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O número total de alelos foi de 143 e o número efetivo alelos por loco variou de três a 21. As heterozigosidades esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) variaram de 0,712 (Sfra18) a 0,953 (Sfra02) e de 0,750 (Sfra10) a 0,950 (Sh05), respectivamente. Não houve evidência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos utilizados nem de endogamia. A probabilidade combinada de exclusão foi de 0,999 e a probabilidade combinada de identidade foi de  $3 \times 10^{-12}$ . O número de pais inferido para as 41 larvas, considerando poligamia em ambos os sexos, foi de 12 fêmeas e 13 machos (Tabela 5.2). As estimativas de  $N_e$  variaram dependendo do método utilizado. Os resultados obtidos pelo programa COLONY, para poligamia em ambos os sexos, foi de 26 indivíduos (95% CI:

16-47) e, através do programa LDNe, os resultados sugerem um tamanho efetivo populacional maior, com tamanho populacional efetivo de 83,7 (95% CI: 42-522) valores entre 42 e 522 indivíduos.

**Tabela 5.1.** Parâmetros de variação genética para as larvas de *S. brasiliensis* da bacia do alto rio Uruguai, baseados em oito locos de microssatélites. Para cada loco apresentam-se: o número de indivíduos analisados (*N*), o número de alelos (*A*), número de alelos efetivos (*Ae*), riqueza alélica (*Ra*), as heterozigosidades observada (*Ho*) e esperada (*He*), o coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) Valores significativos para  $F_{IS}$  se apresentam com asterisco ( $p= 0,001$ ); valores de  $p$  significativos para o desvio EHW estão em negrito, e valores em itálico indicam a presença de alelos nulos. Valores de após correção de Bonferroni ( $p= 0,0063$ ).

Locos	N	A	Ae	Ho	He	$F_{IS}$	$P_{EHW}$
Sfra02	35	29	21	0,857	0,953	0,115	0,006
Sfra03	41	16	4	0,878	0,758	-0,147	0,341
Sfra04	38	11	4	0,789	0,769	-0,014	0,064
Sfra10	40	10	6	0,750	0,842	0,122	<b>0,000</b>
Sfra13	39	21	10	0,897	0,904	0,020	0,412
Sfra18	40	8	3	0,800	0,712	-0,112	0,711
Sfra14	28	22	10	0,786	0,901	0,146	0,098
Sh05	40	26	16	0,950	0,936	-0,003	0,729

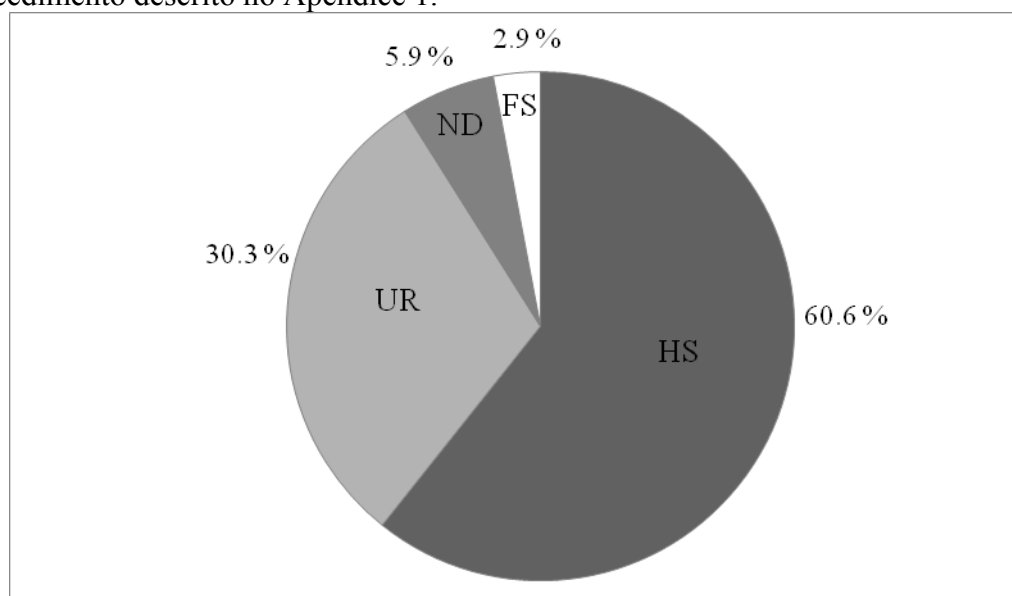
O programa COLONY indicou que os machos M\*4 e M\*6 apresentaram o maior número de progênies, com cinco cada um, e o macho com a menor contribuição foi o M\*13, com uma única larva (L37). A fêmea F#4 contribuiu com oito larvas e a F#10 contribuiu com apenas uma larva (L23). De todas as larvas analisadas, quatro indivíduos (L07, L15, L20 e L41) foram identificados como descendentes dos parentais M\*4-F#4. As larvas L25 e L44 foram atribuídas aos parentais F#12-M#10; as larvas L26 e L35 foram atribuídas aos indivíduos F#6-M\*11 e L08 e L09 aos parentais F#7-M\*5 (Tabela 5.2).

O valor médio de parentesco genético variou de -0,228, entre as larvas L33 e L19, a 0,540, L07 e L15, respectivamente, que foram atribuídas como FS pelo programa COLONY) (Apêndice 1). Através dos resultados obtidos das várias abordagens utilizadas pode-se obter o relacionamento final para 97% do total de 201 combinações entre todas as larvas (Apêndice 1). A maior parte dos indivíduos foi atribuída como HS (122 duplas); 61 pares foram classificados como UR e seis pares de larvas foram identificados como FS (Figura 5.2).

**Tabela 5.2.** Número de progênies atribuídas a cada fêmea e macho, inferidos através de 41 larvas de *S. brasiliensis* amostradas na bacia do alto rio Uruguai. Reconstrução de parentesco conduzida através do programa COLONY (JONES; WANG, 2010).

ID do Macho	Número de progênies	Identificação da Fêmea	Número de progênies
*1	4	#1	4
*2	4	#2	3
*3	3	#3	4
*4	5	#4	8
*5	4	#5	2
*6	5	#6	5
*7	2	#7	5
*8	2	#8	2
*9	2	#9	2
*10	3	#10	1
*11	4	#11	2
*12	2	#12	3
*13	1	-	-

**Figura 5.2.** Proporções de pares classificados como irmãos completos (FS), meio-irmãos (HS), não identificado (ND) ou não relacionados (UR) para as 41 larvas de *S. brasiliensis* da bacia do alto rio Uruguai. As relações foram identificadas utilizando o procedimento descrito no Apêndice 1.



### 5.3 DISCUSSÃO

O presente trabalho utiliza marcadores moleculares para avaliar o de parentesco em progênies selvagens de peixes migradores Neotropicais. Inferimos o sistema de acasalamento de *S. brasiliensis* com base nos resultados obtidos a partir de parentesco genético entre as larvas. Os resultados evidenciam a existência de vários machos e fêmeas participando efetivamente na reprodução durante a desova desta espécie,



corroborando com a hipótese desse estudo. A ocorrência de agregação de peixes e a consequente formação de cardumes durante o período reprodutivo é uma característica comum das espécies de peixes migradores Neotropicais. Sanches e Galetti Jr. (2012) relataram estruturação genética entre populações de *B. hilarii* durante o período reprodutivo. Segundo esses autores, cardumes reprodutivos se organizam de modo a manter a integridade de cada uma das populações, dentro de um mesmo sistema hidrográfico. Um dos poucos trabalhos publicados a partir de observações visuais sobre a reprodução de peixes migradores na natureza relata que durante o momento da reprodução, muitos machos *S. brasiliensis* são acompanhados por uma única fêmea (GODINHO, 2007).

Nossos resultados sugerem a formação de agregações ou cardumes reprodutivos durante a desova e fertilização de *S. brasiliensis*, com a participação efetiva de várias fêmeas e machos (12 e 13, respectivamente). Devemos ressaltar que o número real de reprodutores presentes na agregação durante o momento da desova pode ser maior do que esta estimativa, considerando a possibilidade de grande variação dos pais na fecundidade e sobrevivência prole (HERBINGER *et al.*, 1997), e a possibilidade de não termos amostrado larvas representantes de todos os peixes que desovaram, mas já permitiram identificarmos um elevado número de parentais. Sistemas de acasalamento polígamos foram detectados em diversas espécies de peixes, como o *Salmo salar* L. (GARANT *et al.*, 2001), *Oncorhynchus mykiss* (SEAMONS *et al.*, 2004), *Salvelinus fontinalis* (KANNO *et al.*, 2011), *Poecilia reticulata* (NEFF *et al.*, 2008), *Maccullochella peelii peelii* (ROURKE *et al.*, 2009) e *Simochromis pleurospilus* (SEFC *et al.*, 2012), no entanto, não existem relatos de estudos que abordam o sistema de acasalamento para peixes migradores Neotropicais por meio do estudo de parentesco de progênes.

O acasalamento múltiplo para ambos os sexos em *S. brasiliensis* é importante para maximizar a variabilidade genética e podem trazer inúmeros benefícios à população. Na grande maioria das espécies de peixes, a poligamia em machos pode ajudar a aumentar sua aptidão, por meio da fertilização de ovos de várias fêmeas (BATEMAN, 1948; ARNOLD; DUVALL, 1994; JONES, 2009). Na maioria dos casos, um macho menor terá maiores limitações ao acesso às fêmeas do que seus companheiros de maior porte, de modo que os machos de várias espécies, como para a perca e o salmão do atlântico, evoluíram uma série de estratégias para maximizar o

sucesso de acasalamento e fertilização, a fim de aumentar a sua capacidade de deixar descendentes (MORAN; GARCIA-VAZQUEZ, 1998; COLEMAN; JONES, 2011; GIRNDT *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013). Por outro lado, os benefícios genéticos associados com acasalamentos poligâmicos em fêmeas permanece controverso, e parece ser menos evidente em peixes (JENNIONS; PETRIE, 2000). Acasalamentos múltiplos podem aumentar a variabilidade genética da progênie, contribuindo indiretamente para o aumento da aptidão das fêmeas e, pode resultar em uma maior sobrevivência e reprodução da prole (PETRIE; KEMPENAERS, 1998; WESTNEAT; STEWART, 2003). Em espécies com desova total, a reprodução com um único parceiro poderia comprometer o sucesso reprodutivo, caso este não apresente gametas com qualidade ideal.

Embora tenha sido encontrada uma proporção semelhante de machos e fêmeas que contribuíram na reprodução, alguns indivíduos deixaram um maior número de descendentes do que outros (Tabela 5.2). Para diversas espécies de peixes, a fecundidade aumenta com o tamanho do corpo, e as fêmeas com essas características podem produzir mais ovos em relação a peixes menores, por possuírem maior volume abdominal (WOOTTON, 1990). Machos com maior tamanho do corpo também podem apresentar vantagens durante a reprodução, devido ao aumento das chances de proximidade com as fêmeas durante a liberação de gametas (HUTCHINGS; MYERS, 1994). É importante ressaltar que para peixes migradores como *S. brasiliensis*, trechos lóticos em reservatórios em cascata são reconhecidos como um importante local alternativo para a reprodução (HERMES-SILVA *et al.*, 2009; REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2011; REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2012). O presente estudo foi realizado em um trecho fragmentado por duas usinas hidrelétricas e o local de estudo também sofre outros impactos antrópicos, causados pela pesca e agricultura, os quais podem contribuir para a redução do tamanho efetivo das populações de peixes locais. Com as contínuas alterações de habitat e mudanças climáticas, o entendimento dos mecanismos persistência das populações são importantes e necessários para a sua conservação e manejo. Apesar de se encontrar em um sistema fragmentado por barramentos, os valores de variabilidade genética foram elevados, assim como relatado para indivíduos adultos da espécie (LOPES *et al.*, 2007; ROSSINI, 2010; GOMES *et al.*, 2013).

Acasalamentos poligâmicos podem permitir mais oportunidades para a reprodução aos indivíduos subordinados, que de outra forma não teriam chances de

participar da reprodução (NUNNEY, 1993), além de aliviarem os efeitos adversos da endogamia (PLESNAR-BIELAK *et al.*, 2013). Em populações naturais os valores  $N_e$  são influenciados por diversos fatores, tais como o tamanho da população, razão sexual reprodutiva e a variação no sucesso reprodutivo (WRIGHT, 1931, 1938). Para o presente trabalho não foi possível estabelecer se os indivíduos de *S. brasiliensis* analisados apresentam baixos valores de  $N_e$  históricos, ou se os valores foram reduzidos nos últimos tempos devido a perturbações antrópicas. Os resultados apresentados devem ser utilizados como modelo para futuras pesquisas de investigação do sistema de reprodução natural de espécies de peixes migradores Neotropicais.

## CONCLUSÕES

- ♣ Os locos de microssatélites utilizados no presente estudo foram eficientes na amplificação e verificação de polimorfismo em *S. brasiliensis*.
- ♣ Os níveis de diversidade genética encontrados em todas as populações de *S. brasiliensis* foram elevados e similares a outras espécies de peixes migradores Neotropicais.
- ♣ Encontramos estruturação genética em populações de *S. brasiliensis* na bacia do alto e médio rio Uruguai amostradas no período reprodutivo, com a existência de quatro grupos genéticos distintos durante o primeiro período reprodutivo estudado. Não foi verificado isolamento por distância na região estudada, mas detectou-se a existência de estruturação genética temporal, também conhecida como isolamento por tempo (IBT).
- ♣ As populações amostrais do período não-reprodutivo não apresentaram isolamento por distância.
- ♣ Identificou-se variação genética entre populações amostrais de dois períodos não-reprodutivos na bacia do alto e médio rio Uruguai.
- ♣ As populações de *S. brasiliensis* que estão sob influência dos barramentos hidrelétricos UHE Itá, UHE Machadinho e UHE Barra Grande apresentaram níveis de diversidade genética similares à outras espécies migradoras Neotropicais;
- ♣ Detectou-se estruturação genética entre populações de *S. brasiliensis* a montante e a jusante da UHE Itá, a qual se deve, provavelmente, a existência de um cânion que foi inundado pelo reservatório de Itá no ano 2000. A presença da barragem UHE Itá mantêm as populações fragmentadas.
- ♣ As populações amostrais a jusante e a montante da UHE Machadinho constituem uma única população genética, que encontra-se fragmentada pelo recente barramento da UHE Machadinho.
- ♣ A análise de parentesco em larvas oriundas de desova natural indicaram agregação reprodutiva e poligamia para *S. brasiliensis*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do Capítulo 2 indicam a existência de quatro populações durante o período reprodutivo 2010/2011, devido a um mecanismo chamado de isolamento por tempo (IBT) mas que também já foi relatado como ondas de desova “spawning waves”. Essa informação deve ser considerada para a geração de diretrizes como a formação e manutenção de bancos genéticos para conservação genética da espécie, escolha de reprodutores para programas de repovoamento, aonde diversas populações precisam ser amostradas ao longo do período reprodutivo, buscando uma maior amostragem da diversidade genética além de manter o período de defeso por todo esse período de migração reprodutiva formada por diversas populações.

Os resultados do Capítulo 3 revelaram diferenciação entre peixes coletados em diferentes anos no período não-reprodutivo. Algumas suposições podem explicar esses resultados, como o fato de que populações de *S. brasiliensis* possam ocupar diferentes áreas ao longo do rio e não apresentarem fidelidade por áreas de alimentação. Essas populações de dourado dão indicativo de se manterem organizadas até mesmo no período não-reprodutivo, mostrando discordância com os conhecimentos de comportamento que se tinha para essa espécie. Esse resultado traz um indicativo da necessidade de manter um controle de pesca para os dourados no rio Uruguai, mesmo fora do período de reprodução.

O Capítulo 4 apresentou o impacto da UHE Machadinho e UHE Barra Grande sobre o tamanho populacional efetivo de *S. brasiliensis* na bacia do Alto rio Uruguai. Esses resultados são indicativo de necessidade de um manejo adequado, de controle da pesca nessa região, direcionamento de repovoamento levando em consideração a estrutura genética da espécie, que é formada por uma única população genética a jusante da UHE Itá. Adicionalmente, o rio Ligeiro deve ser considerado como área prioritária de conservação, pois ocorrem desovas de peixes migradores nessa área. A população a jusante da UHE Itá deve ser tratada como uma população diferente geneticamente da população a montante da referida usina hidrelétrica.

Os resultados do Capítulo 5 revelam poligamia durante a desova e fertilização de *S. brasiliensis* em ambiente natural. Os resultados apresentados são inovadores e devem ser utilizados como modelo para futuras pesquisas de investigação do sistema de reprodução natural de espécies de peixes migradores Neotropicais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGOSTINHO, A. A. et al. Estratificación espacial y comportamiento de *Prochilodus scrofa* em distintas fases del ciclo de vida, en la planicie de inundación del alto rio Paraná y embalse de Itaipu, Paraná, Brasil. **Revue D'Hydrobiologie Tropicale**, v. 26, p. 79-90, 1993.

AGOSTINHO, A. A. et al. Fish ladder of Lajeado Dam: migrations on one-way routes? **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 121-130, 2007.

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

AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 1119-1132, 2008.

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

ALLAN, J. D.; FLECKER, A. S. Biodiversity conservation in running waters. **BioScience**, p. 32-43, 1993.

ALLENDORF, F. W.; RYMAN, N. The role of genetics in population viability analysis. **Population viability analysis**, p. 50-85, 2002.

ANA- Agência Nacional de Águas. Disponível em: <http://www2.ana.gov.br/Paginas/default.aspx>. Acesso em: 02 dezembro de 2013.

ARNOLD, S. J.; DUVALL, D. Animal mating systems: a synthesis based on selection theory. **American Naturalist**, p. 317-348, 1994.

AYRES, M. et al. Bioestat: Versão 5.8.4. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. MCT-CNPQ, 2007.

AZEVEDO, P. Reprodução dos peixes de água doce. **Caça e Pesca** 12:16, 1953.

BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A. Influência de fatores abióticos na reprodução do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* do rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 12, n. 2, p. 85-91, 2000.

BARROCA, T. M. et al. Genetic diversity and population structure of *Prochilodus costatus* and *Prochilodus argenteus* preceding dam construction in the Paraopeba River,

São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil. **Open Journal of Genetics**, v. 2012, 2012.

BARROSO, R. M. et al. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 2, p. 297-298, 2003.

BATEMAN, A. J. Intra-sexual selection in *Drosophila*. **Heredity**, v. 2, n. 3, p. 349-368, 1948.

BAXTER, R. M. Environmental effects of dams and impoundments. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 8, n. 1, p. 255-283, 1977.

BEHRMANN-GODEL, J.; GERLACH, G.; ECKMANN, R. Kin and population recognition in sympatric Lake Constance perch (*Perca fluviatilis* L.): can assortative shoaling drive population divergence? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 59, n. 4, p. 461-468, 2006.

BELKHIR, K. et al. GENETIX 4.05, software under Windows™ for the genetics of populations. **University of Montpellier, Montpellier, France**, 2004.

BESSERT, M. L.; ORTÍ, G. Genetic effects of habitat fragmentation on blue sucker populations in the upper Missouri River (*Cycleptus elongatus* Lesueur, 1918). **Conservation Genetics**, v. 9, n. 4, p. 821-832, 2008.

BINDER, T; R; COOKE, S. J.; HINCH, S. G. **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**, Vol. 3, 1921-1927, 2011.

BLOUIN, M. S. et al. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 3, p. 393-401, 1996.

BYRNE, R. J.; BERNARDI, G.; AVISE, J.C. Spatiotemporal genetic structure in a protected marine fish, the California Grunion (*Leuresthes tenuis*), and relatedness in the genus *Leuresthes*. **Journal of Heredity**, v. 104, n. 4, p. 521-531, 2013.

CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; GALETTI JR, P. M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 377-380, 2008.

COLEMAN, S.W.; JONES, A. G. Patterns of multiple paternity and maternity in fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 103, n. 4, p. 735-760, 2011.

COOLEY, J. R.; SIMON, C.; MARSHALL, D. C. Temporal separation and speciation in periodical cicadas. **Bioscience**, v. 53, n. 2, p. 151-157, 2003.

COULSON, M. W.; BRADBURY, I. R.; BENTZEN, Paul. Temporal genetic differentiation: continuous v. discontinuous spawning runs in anadromous rainbow smelt *Osmerus mordax* (Mitchill). **Journal of fish biology**, v. 69, p. 209-216, 2006.

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

- DEWOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **Journal of Fish Biology**, v. 56, n. 3, p. 461-473, 2000.
- DOHERTY, P. J.; PLANES, S.; MATHER, P. Gene flow and larval duration in seven species of fish from the Great Barrier Reef. **Ecology**, p. 2373-2391, 1995.
- DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological reviews**, v. 81, n. 2, p. 163-182, 2006.
- DUGAN, P. J. et al. Fish migration, dams, and loss of ecosystem services in the Mekong basin. **Ambio**, v. 39, n. 4, p. 344-348, 2010.
- DUNN, I. S.; BLATTNER F. R. Sharons 36 to 40: multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polyinkers and polystuffers. **Nucleic Acids Research**, v. 15, p. 2677-2698, 1987.
- EARL, D. A. et al. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.
- EBERHARD, W. G.; CORDERO, C. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products-a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, n. 12, p. 493-496, 1995.
- ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual review of Ecology and Systematics**, v. 24, n. 1, p. 217-242, 1993.
- ESGUÍCERO, A. L. H.; ARCIFA, M. S. Fragmentation of a Neotropical migratory fish population by a century-old dam. **Hydrobiologia**, v. 638, n. 1, p. 41-53, 2010.
- ESPÍNOLA, L. A. et al. Effects of decadal changes in the hydrological regime of the middle reach of the Paraná River (Argentina) on fish densities. **Environmental Biology of Fishes**, p. 1-15, 2013.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p. 47, 2005.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, n. 4, p. 1567-1587, 2003.



FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 574-578, 2007.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, p. 294-299, 1994.

FRANKHAM, R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetical Research**, v. 66, n. 02, p. 95-107, 1995.

FRANKHAM, R. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 1, p. 325-333, 2008.

FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Evolutionary analysis**. Upper Saddle River (NJ): Pearson Education, 2004.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. Disponível em: <http://www.fishbase.org/>. Acesso em: 13 de janeiro de 2014.

FU, C. et al. Freshwater fish biodiversity in the Yangtze River basin of China: patterns, threats and conservation. **Biodiversity & Conservation**, v. 12, n. 8, p. 1649-1685, 2003.

GARANT, D.; DODSON, J. J.; BERNATCHEZ, L. A genetic evaluation of mating system and determinants of individual reproductive success in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Heredity**, v. 92, n. 2, p. 137-145, 2001.

GARANT, D.; KRUK, L. E. B. How to use molecular marker data to measure evolutionary parameters in wild populations. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 7, p. 1843-1859, 2005.

GARCEZ, R. et al. Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from Rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 21, n. 3, p. 268-275, 2011.

GARCIA DE LEON, F. J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Molecular Ecology**, v. 6, n. 1, p. 51-62, 1997.

GASTON, K. J.; SPICER, J. I. **Biodiversity: an introduction**. John Wiley & Sons, 2009.

GIRNDT, A. et al. Multiple paternity in different populations of the sailfin molly, *Poecilia latipinna*. **Animal Biology**, v. 62, p. 245-262, 2012.

GODINHO, A. L.; LAMAS, I. R.; GODINHO, Hugo Pereira. Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. **Environmental biology of fishes**, v. 87, n. 2, p. 143-162, 2010.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil, subordem Characoidei: bacia do rio Mogí Guassú**. Editora Franciscana, 1975.

GOMES, P. C. et al. Genetic diversity of *Salminus brasiliensis* (Characiformes: Characidae) collected in the passage ladder of the Canoas I hydropower plant in the Paranapanema River, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1421-1432, 2013.

GOTELLI, N. J.; TAYLOR, C. M. Testing metapopulation models with stream-fish assemblages. **Evolutionary Ecology Research**, v. 1, n. 7, p. 835-845, 1999.

GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices** (version 2.9.3). 2001.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, p. 361-372, 1992.

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

HALKETT, F. et al. Temporal differentiation and spatial coexistence of sexual and facultative asexual lineages of an aphid species at mating sites. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 19, n. 3, p. 809-815, 2006.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. 1999. p. 95-98.

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

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

HAUSER, L.; CARVALHO, G. R. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. **Fish and Fisheries**, v. 9, n. 4, p. 333-362, 2008.

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

HE, Y.; WANG, J. Temporal variation in genetic structure of the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) in its type locality revealed by microsatellite markers. **Biochemical genetics**, v. 48, n. 3-4, p. 312-325, 2010.

HEBERT, P. DN et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HENDRY, A. P.; BERG, O. K.; QUINN, T. P. Condition dependence and adaptation-by-time: breeding date, life history, and energy allocation within a population of salmon. **Oikos**, p. 499-514, 1999.

HENDRY, A. P.; DAY, Troy. Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. **Molecular ecology**, v. 14, n. 4, p. 901-916, 2005.

HERBINGER, C. M. et al. Family relationships and effective population size in a natural cohort of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 54, n. S1, p. 11-18, 1997.

HERMES-SILVA, S. **Distribuição espacial e temporal do ictioplâncton no Alto Rio Uruguai**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

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.

HERNANDEZ-MARTICH, J. D.; SMITH, M. H. Downstream gene flow and genetic structure of *Gambusia holbrooki* (eastern mosquitofish) populations. **Heredity**, v. 79, n. 3, 1997.

HUTCHINGS, J. A.; MYERS, R. A. The evolution of alternative mating strategies in variable environments. **Evolutionary Ecology**, v. 8, n. 3, p. 256-268, 1994.

JAGER, H. I. et al. A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. **Environmental Biology of Fishes**, v. 60, n. 4, p. 347-361, 2001.

JENNIONS, M. D.; PETRIE, M. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. **Biological Reviews**, v. 75, n. 1, p. 21-64, 2000.

JONES, A. G. On the opportunity for sexual selection, the Bateman gradient and the maximum intensity of sexual selection. **Evolution**, v. 63, n. 7, p. 1673-1684, 2009.

JONES, O. R.; WANG, J. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 551-555, 2010.

JØRGENSEN, H. B. H. et al. Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 10, p. 3219-3234, 2005.

JØRGENSEN, H. B. H.; HANSEN, M. M.; LOESCHCKE, V. Spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.) in the southwestern Baltic Sea: do they form genetically distinct spawning waves? **ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil**, v. 62, n. 6, p. 1065-1075, 2005.

KALINOWSKI, S. T.; WAGNER, A. P.; TAPER, M. L. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 2, p. 576-579, 2006.

KANNO, Y.; VOKOUN, J. C.; LETCHER, B. H. Sibship reconstruction for inferring mating systems, dispersal and effective population size in headwater brook trout (*Salvelinus fontinalis*) populations. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 619-628, 2011.

KELLER, I.; LARGIADER, C. R. Recent habitat fragmentation caused by major roads leads to reduction of gene flow and loss of genetic variability in ground beetles. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1513, p. 417-423, 2003.

KIMURA, M.; CROW, J. F. On the maximum avoidance of inbreeding. **Genetical Research**, v. 4, n. 03, p. 399-415, 1963.

KNUTSON, M. G. et al. Effects of landscape composition and wetland fragmentation on frog and toad abundance and species richness in Iowa and Wisconsin, USA. **Conservation Biology**, v. 13, n. 6, p. 1437-1446, 1999.

KONOVALOV, D. A.; MANNING, C.; HENSHAW, M. T. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 4, p. 779-782, 2004.

KOVACH, R. P.; GHARRETT, A. J.; TALLMON, D. A. Temporal patterns of genetic variation in a salmon population undergoing rapid change in migration timing. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 5, p. 795-807, 2013.

LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 34, n. 2, p. 111-119, 2005.

LIMA, F. C. T. **Revisão taxonômica e relações filogenéticas do gênero *Salminus* (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae)**. 253p. Tese (Doutorado em Zoologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LIU, J. et al. Molecular evidence for multiple paternity in a population of the viviparous Tule Perch *Hysterocarpus traski*. **Journal of Heredity**, v. 104, n. 2, p. 217-222, 2013.

LLOYD, M.; WHITE, J. A. Sympatry of periodical cicada broods and the hypothetical four-year acceleration. **Evolution**, p. 786-801, 1976.

LOPES, C. M. et al. Fish passage ladders from Canoas Complex-Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 131-138, 2007.

LOVELESS, Marilyn D.; HAMRICK, James L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual review of ecology and systematics**, p. 65-95, 1984.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999.

LOWE-MCCONNELL, R. H. Fish communities in tropical freshwaters. In: **Fish communities in tropical freshwaters**. Longman, 1975.

LUIKART, G.; CORNUET, J. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation biology**, v. 12, n. 1, p. 228-237, 1998.

MACE, G. M.; LANDE, R. Assessing extinction threats: toward a reevaluation of IUCN threatened species categories. **Conservation Biology**, v. 5, n. 2, p. 148-157, 1991.

MACE, G. M.; NORRIS, K.; FITTER, A. H. Biodiversity and ecosystem services: a multilayered relationship. **Trends in ecology & evolution**, v. 27, n. 1, p. 19-26, 2012.

MACHADO C. **Aspectos reprodutivos do dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) (Teleostei, Characidae) na região do alto rio Uruguai, Brasil**. 61p. Dissertação (Mestrado em aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

MAES, G. E. et al. Evidence for isolation by time in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Molecular ecology**, v. 15, n. 8, p. 2095-2107, 2006.

MATSUMOTO, C. K.; HILSDORF, A. W. S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 395-402, 2009.

MCPHERSON, A. A.; STEPHENSON, R. L.; TAGGART, C. T. Genetically different Atlantic herring *Clupea harengus* spawning waves. **Marine ecology progress series**, v. 247, p. 303-309, 2003.

MELO, B. F. et al. The roles of marginal lagoons in the maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *P. costatus*. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 625-636, 2013.

MEURER, S. **Implantação de barragens no alto rio Uruguai (Brasil): influência sobre a assembleia e biologia das principais espécies de peixes.** 106p. Tese (Doutorado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

MIÑO, C. I. et al. Reconstructing genetic mating systems in the absence of parental information in colonially breeding waterbirds. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 196, 2011.

MMA (Ministério do Meio Ambiente) **Convenção sobre Diversidade Biológica, Série Biodiversidade no.1**, 2010. 30p.

MORAIS FILHO, M. B.; SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do dourado:(*Salminus maxillosus* val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae).** Ministério da Agricultura. Divisão do Caça e Pesca, 1955.

MORAN, P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brief communication. Multiple paternity in Atlantic salmon: a way to maintain genetic variability in relict populations. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 6, p. 551-553, 1998.

MORITZ, C. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 9, n. 10, p. 373-375, 1994.

NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação.** Maringá, EDUEM, 2001, 378p.

NARUM, S. R. et al. Microsatellites reveal population substructure of Klickitat River native steelhead and genetic divergence from an introduced stock. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 26, n. 1, p. 147-155, 2006.

NEFF, B. D.; PITCHER, T. E.; RAMNARINE, Indar W. Inter-population variation in multiple paternity and reproductive skew in the guppy. **Molecular ecology**, v. 17, n. 12, p. 2975-2984, 2008.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, p. 1-10, 1975.

NERAAS, L. P.; SPRUELL, P. Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 5, p. 1153-1164, 2001.

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

NUNNEY, L. The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. **Evolution**, p. 1329-1341, 1993.

- OEA- Organización dos Estados Americanos. **Cuenca Del Rio de La Plata**. Estudio para su planificación y desarrollo. Inventario de datos hidrológicos y climáticos, 1969.
- PAETKAU, D. Using genetics to identify intraspecific conservation units: a critique of current methods. **Conservation Biology**, p. 1507-1509, 1999.
- PALSBØLL, P.J.; BERUBE, M.; ALLENDORF, F. W. Identification of management units using population genetic data. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 1, p. 11-16, 2007.
- PALSTRA, F. P.; RUZZANTE, D. E. Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? **Molecular Ecology**, v. 17, n. 15, p. 3428-3447, 2008.
- PAPA, R. et al. Assessment of genetic variation between reproductive ecotypes of Klamath River steelhead reveals differentiation associated with different run-timings. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, n. 2, p. 142-146, 2007.
- PEAKALL, Rod; SMOUSE, Peter E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.
- PETREIRE JR, M. A pesca comercial no rio Solimões-Amazonas e seus afluentes: análise dos informes do pescado desembarcado no Mercado Municipal de Manaus (1976-1978). **Ciência e Cultura**, v. 37, n. 12, p. 1987-1999, 1985.
- PETRIE, M.; KEMPENAERS, B. Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 13, n. 2, p. 52-58, 1998.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. BOTTLENECK: a program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. **Montpellier**, France, 1999.
- PLESNAR-BIELAK, A. et al. Mating system affects population performance and extinction risk under environmental challenge. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1747, p. 4661-4667, 2012.
- POFF, N. L. et al. The natural flow regime. **BioScience**, v. 47, n. 11, p. 769-784, 1997.
- POFF, N. L.; OLDEN, J. D.; STRAYER, D. L. Climate change and freshwater fauna extinction risk. In: **Saving a Million Species**. Island Press/Center for Resource Economics, p. 309-336, 2012.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- PUMITINSEE, P. et al. Temporal genetic heterogeneity of juvenile orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*, Pisces: Serranidae). **Aquaculture research**, v. 40, n. 10, p. 1111-1122, 2009.

QUELLER D.C.; GOODNIGHT K.F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v. 43, p. 258-275, 1989.

QUINN, J. F.; HARRISON, S. P. Effects of habitat fragmentation and isolation on species richness: evidence from biogeographic patterns. **Oecologia**, v. 75, n. 1, p. 132-140, 1988.

QUINN, T. P.; BUSACK, C. A. Chemosensory recognition of siblings in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Animal Behaviour**, v. 33, n. 1, p. 51-56, 1985.

RAMELLA, M. 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.

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

REID, S. M. et al. Population structure and genetic diversity of black redhorse (*Moxostoma duquesnei*) in a highly fragmented watershed. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 3, p. 531-546, 2008.

REYNALTE-TATAJE D. A. et al. **Distribuição de ovos e larvas de peixes na área de influência do reservatório de Itá (Alto Rio Uruguai)**. Reservatório de Itá: estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologias de cultivo e conservação da ictiofauna. Florianópolis: Editora UFSC, p. 127-158, 2008.

REYNALTE-TATAJE, D. A. 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.

REYNALTE-TATAJE, D. A. et al. Temporal distribution of ichthyoplankton in the Ivinhema River (Mato Grosso do Sul State/Brazil): influence of environmental variables. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 2, p. 427-436, 2011.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, p. 223-225, 1989.

ROGERS, S. D.; PEACOCK, M. M. The disappearing northern leopard frog (*Lithobates pipiens*): conservation genetics and implications for remnant populations in western Nevada. **Ecology and evolution**, v. 2, n. 8, p. 2040-2056, 2012.

ROSSINI, B. C. **Caracterização da estrutura genética de populações residentes e migradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da Bacia do rio Mogi-Guaçu**. 140p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2010.

ROSSINI, B. C. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci of the freshwater fish *Salminus franciscanus*. **Molecular Ecology Resources**, 2010.



ROUMET, M. et al. How to escape from crop-to-weed gene flow: phenological variation and isolation-by-time within weedy sunflower populations. **New Phytologist**, v. 197, n. 2, p. 642-654, 2013.

ROURKE, M. L. et al. Polygamy and low effective population size in a captive Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) population: genetic implications for wild restocking programs. **Marine and Freshwater Research**, v. 60, n. 8, p. 873-883, 2009.

ROUSSET, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. **Genetics**, v. 145, n. 4, p. 1219-1228, 1997.

RUNDLE, H. D.; NOSIL, P. Ecological speciation. **Ecology letters**, v. 8, n. 3, p. 336-352, 2005.

SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p. 889-895, 2007.

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

SARTORI, M. G. B. O clima de Santa Maria, RS: do Regional ao Urbano. 1979. 150f. Mestrado (Mestrado em Geografia) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 1979.

SCHINDLER, D. E. et al. Population diversity and the portfolio effect in an exploited species. **Nature**, v. 465, n. 7298, p. 609-612, 2010.

SCHLOSSER, I. J.; ANGERMEIER, P. L. Spatial variation in demographic processes of lotic fishes: conceptual models, empirical evidence, and implications for conservation. In: **American Fisheries Society Symposium**. 1995. p. 392-401.

SCHMIDT, P. S.; RAND, D. M. Adaptive maintenance of genetic polymorphism in an intertidal barnacle: habitat-and life-stage-specific survivorship of *mpi* genotypes. **Evolution**, v. 55, n. 7, p. 1336-1344, 2001.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, 2000.

SCHÜTZ, J. A.; NUÑER, A. P. O.; ZANIBONI-FILHO, E. **Biotelemetria de peixes migradores no Alto rio Uruguai**. Reservatório de Itá: estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologias de cultivo e conservação da ictiofauna. Florianópolis, Editora da UFSC, 2008. 319p.

SEAMONS, T. R.; BENTZEN, P.; QUINN, T. P. The mating system of steelhead, *Oncorhynchus mykiss*, inferred by molecular analysis of parents and progeny. **Environmental Biology of Fishes**, v. 69, n. 1-4, p. 333-344, 2004.

SEFC, K. M. et al. Brood mixing and reduced polyandry in a maternally mouth brooding cichlid with elevated among-breeder relatedness. **Molecular ecology**, v. 21, n. 11, p. 2805-2815, 2012.

SIITONEN, L.; GALL, G. A. E. Response to selection for early spawn date in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture**, v. 78, n. 2, p. 153-161, 1989.

SILVA, J. V.; HILSDORF, A. W. S. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 3, p. 437-439, 2011.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTI, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 407-417, 2001.

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

SOLDANO, F. A. **Régimen y aprovechamiento de la red fluvial argentina**. Editorial Cimera, 1947.

STRAYER, D. L.; DUDGEON, D. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 29, n. 1, p. 344-358, 2010.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TEMPLETON, A. R. Using haplotype trees for phylogeographic and species inference in fish populations. In: **Genetics of Subpolar Fish and Invertebrates**. Springer Netherlands, 2004. p. 7-20.

TESSIER, N; BERNATCHEZ, L. Stability of population structure and genetic diversity across generations assessed by microsatellites among sympatric populations of landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Molecular Ecology**, v. 8, n. 2, p. 169-179, 1999.

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

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**, Maringá, EDUEM/SBI, 1996. 169p.

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

VÖRÖSMARTY, C. J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 555-561, 2010.

WANG, J. A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 10, p. 2148-2164, 2009.

WAPLES, R. S. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 5, p. 438-450, 1998.

WAPLES, R. S.; DO, C. H. I. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. **Molecular ecology resources**, v. 8, n. 4, p. 753-756, 2008.

WASKO, A. P.; GALETTI JR, P. M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiology**, v. 474, n. 1-3, p. 131-137, 2002.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. Clark. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, p. 1358-1370, 1984.

WELCOMME, R. L. **Fisheries ecology of floodplain rivers**. London: Longman, 1979.

WELCOMME, R. L. **River fisheries**. FAO, Documento Tecnico de Pesca (FAO), 1992.

WESTNEAT, D. F.; STEWART, I. RK. Extra-pair paternity in birds: causes, correlates, and conflict. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, p. 365-396, 2003.

WINEMILLER, K. O. Life history strategies, population regulation, and implications for fisheries management. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 62, n. 4, p. 872-885, 2005.

WINEMILLER, K. O.; ROSE, Kenneth A. Patterns of life-history diversification in North American fishes: implications for population regulation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 49, n. 10, p. 2196-2218, 1992.

WOOTTON, R. J. **Ecology of teleost fishes**. Croom Helm, London, 1990.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations: Variability Within and Among Natural Populations**. A Treatise in Four Volumes: Vol. 4. University of Chicago Press, 1978.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97, 1931.

WRIGHT, S. Size of population and breeding structure in relation to evolution. **Science**, v. 87, n. 2263, p. 430-431, 1938.

XU, Z. et al. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture**, v. 199, n. 1, p. 13-40, 2001.

YAMAMOTO, S. et al. Genetic differentiation of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: spatial-temporal changes in gene frequencies. **Conservation Genetics**, v. 5, n. 4, p. 529-538, 2004.

YAMAMOTO, S.; SOTA, T. Parallel allochronic divergence in a winter moth due to disruption of reproductive period by winter harshness. **Molecular ecology**, v. 21, n. 1, p. 174-183, 2012.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U. H. **Migratory fishes of the Uruguay River. Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status.** World Fisheries Trust, 1era. Ed., Victoria, Canada, 2003. 372p.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Protocolo de extração de DNA através do método Aljanabi e Martinez (1997), com modificações:

O DNA das amostras de *S. brasiliensis* foi extraído a partir de fragmentos de nadadeira caudal, armazenados em álcool 100%, seguindo o método de:

- Colocou-se aproximadamente 50 mg de tecido (nadadeira) de cada um dos peixes em microtubos individuais e identificados de 1,5ml;
- Adicionou-se 300µl de solução tampão salino pH= 8,0 (NaCl 0,4mol/l; TrisHCl 10mmol/l e EDTA 2mmol/l); 60 µl de SDS 10% e 8 µl de Proteinase K 20mg/ml;
- Agitou-se levemente as amostras;
- Incubou-se as amostras a 55°C por aproximadamente 12 horas.
- Adicionou-se 300µl de NaCl 6mol/l e agitou-se em vortex por 30 segundos em velocidade máxima;
- Centrifugou-se por 30 minutos a 13.000 rpm em microcentrífuga;
- Transferiu-se o sobrenadante de cada uma das amostras para outros microtubos devidamente identificados;
- Adicionou-se ao sobrenadante o mesmo volume de isopropanol gelado;
- Agitou-se cuidadosamente o microtubo contendo as amostras e armazenou-se em freezer a -20°C por 12 horas;
- Centrifugou-se o microtubo contendo as amostras e adicionou-se 400ul de etanol 100% gelado;
- Centrifugou-se novamente e verteu-se o sobrenadante;
- Adicionou-se ao *pellet* 400ul de etanol 70% gelado e em seguida centrifugou-se;
- Verteu-se o sobrenadante e em seguida o *pellet* de DNA e acondicionou-se em estufa a 37°C por aproximadamente 1 hora.
- Após seco o *pellet* foi eluído em 50µl de água Milli-Q autoclavada;

**Anexo 2.** Características dos locos de microssatélites que foram utilizados em indivíduos de *Salminus brasiliensis*. Para cada loco apresentam-se o nome do *primer*, as suas sequências *forward* (F) e *reverse* (R) e o código de acesso do Genbank. Os locos denominados Sfra foram desenvolvidos para *Salminus brasiliensis* (ROSSINI *et al.*, 2010); os locos Sh foram desenvolvidos para *Salminus hilarii* (SILVA; HILSDORF, 2011) e o loco BOM2 foi desenvolvido para *Brycon opalinus* (BARROSO *et al.*, 2003).

Loco	Unidade Repetitiva ( <i>motif</i> )	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Acesso Genbank
Sfra02	(GT)18	F: GCAGTCCTCACTACGTATAGT R: CTCGCTTCACAACCTGAC	HQ317313
Sfra03	(CA)14	F: GCATAGGAGCATTCACTC R: GACACCCAGACTCCAAAC	HQ317314
Sfra04	(AC)6tctcgetcaca(CACG)4	F: ATTTAGCTGTTCGGCTGA R: CGGCTTATGTGACGTAGAG	HQ317315
Sfra05	(TCTG)6	F: GTTCAGGACGTTAGCTAGC R: GTCGTCGACATTTGGGTA	HQ317316
Sfra10	(CTGT)3ccgccc(GTCT)3	F: CTGAACGCAGCTGTCTG R: CCCTGACCTAACCAACG	HQ317320
Sfra14	(CT)13(CA)8	F: GAAATCTCCAAGCCTGAG R: GAAAGAACTCGTTTTCTCAG	HQ317324
Sfra15	(GT)31(GA)10	F: AGATTCCCGTCAGACCA R: CAAATGAGCTTGCCTTAC	HQ317325
Sfra18	(GACA)6gaa(AGAC)4	F: GAACAGCAACAACGGACA R: CATCCGAGGTCAGAGGTAG	HQ317326
Sh05	(TG)15	F: CTA TCT GAT ACG CCC CGG TC R: CTC GTC CAG GGT CAT CTC CTT A	HQ533134
Sh56	(GT)6	F: CTT CAC CCT CTC TGC TTC TTG T R: TTG ACT TTT GCC TCT AAC CCA T	HQ533140
BoM2	(CA)45	F: CTGGGCAGCGGAAGAG R: CCCACATCTCTCCCCTTCG	AF513622

## APÊNDICES

**Apêndice 1.** Detalhes da data de coleta de cada uma das amostras das três populações amostrais podem ser visualizados na tabela abaixo.

<b>Indivíduos JUHE-MA</b>		
Indivíduo	Mês da coleta	Ano da coleta
P251	Fevereiro	2010
IBQ111	Outubro	2006
IPX119	Maio	2006
JMA1	Novembro	2010
JMA2	Novembro	2010
JMA3	Novembro	2010
JMA4	Janeiro	2011
JMA5	Janeiro	2011
JMA6	Janeiro	2011
JMA7	Janeiro	2011
JMA8	Janeiro	2011
JMA 9	Janeiro	2011
JMA10	Janeiro	2011
JMA11	Janeiro	2011
JMA12	Janeiro	2011
JMA13	Janeiro	2011
JMA14	Fevereiro	2011
JMA15	Fevereiro	2011
JMA16	Fevereiro	2011
BQ 88	Outubro	2006
RI51	Novembro	2009
RI52	Novembro	2009
RI53	Novembro	2009
RI54	Novembro	2009
RI55	Novembro	2009
RI56	Novembro	2009
RI57	Novembro	2009
RI58	Novembro	2009
RI59	Novembro	2009

<b>Indivíduos JUHE-BG</b>		
MC89	Outubro	2007
MC32	Fevereiro	2009
MC6	Novembro	2006
MC7	Novembro	2006
MC8	Novembro	2006
MPB42	Novembro	2006
MPB58	Novembro	2009
MPBMO4	Agosto	2012
MZ34	Novembro	2011
MZ49	Julho	2009
MZ66	Fevereiro	2009
MZ91	Dezembro	2003

<b>Indivíduos JUHE-IT</b>		
I04	Outubro	2010

I07	Outubro	2010
I09	Outubro	2010
I10	Outubro	2010
I12	Outubro	2010
I20	Outubro	2010
I25	Novembro	2010
I33	Novembro	2010
I36	Novembro	2010
I40	Novembro	2010
I60	Dezembro	2010
I61	Dezembro	2010
I65	Dezembro	2010
I67	Dezembro	2010
I73	Dezembro	2010
I75	Dezembro	2010
I80	Dezembro	2010
I83	Janeiro	2011
I85	Janeiro	2011
I86	Janeiro	2011
I89	Janeiro	2011
I98	Janeiro	2011
I105	Janeiro	2011
I107	Janeiro	2011
I109	Janeiro	2011
I117	Fevereiro	2011
I121	Fevereiro	2011
I125	Fevereiro	2011
I156	Julho	2011
I163	Julho	2011
I168	Julho	2011

---



**Apêndice 1.** Parentesco inferido entre os pares de larvas de *Salminus brasiliensis*, provenientes da bacia do Alto rio Uruguai, Santa Catarina/Rio Grande do Sul, Brasil. Para cada par, apresenta-se a categoria de relacionamento mais provável identificada por máxima verossimilhança e os valores de probabilidade ( $p$ ) para o teste hipóteses (programa ML-RELATE, Kalinowski et al. 2006), o valor de parentesco genético mais provável para cada par de larvas segundo Queller e Goodnight (1989) (Q&Gr) (programa KINGROUP, Konovalov et al., 2004) e o relacionamento inferido mais provável (RI) (programa COLONY, Jones e Wang, 2010). FS: irmãos-completos; HS: meios-irmãos; UR: não relacionados; ND: não definido. H0 (hipótese nula), H1 (hipótese alternativa). Abordagem metodológica baseada em Miño et al. (2011).

Par	ML-RELATE		KINGROUP	COLONY		Parentesco Inferido
	H0-H1	$p$	$r$ (Q&Gr)	RI	$p$	
L07-L15	FS/HS	0,0528	0,547	FS	1,000	FS
L15-L20	FS/HS	0,0746	0,295	FS	1,000	FS
L25-L44	FS/HS	0,0390	0,256	FS	0,833	FS
L26-L35	HS/FS	0,1540	0,329	FS	0,966	FS
L30-L41	HS/FS	0,1879	0,305	FS	0,000	FS
L35-L37	FS/HS	0,0505	0,276	FS	1,000	FS
L01-L04	HS/FS	0,0174	0,109	HS	1,000	HS
L01-L11	HS/FS	0,0011	0,037	HS	0,999	HS
L01-L13	HS/FS	0,0258	0,185	HS	1,000	HS
L01-L30	HS/FS	0,0219	0,294	HS	1,000	HS
L01-L32	HS/FS	0,0744	0,282	HS	1,000	HS
L01-L40	HS/FS	0,0060	0,145	HS	1,000	HS
L02-L06	HS/FS	0,0613	0,181	HS	0,929	HS
L02-L25	HS/FS	0,0046	0,206	HS	0,016	HS
L02-L42	HS/FS	0,0404	0,324	HS	0,975	HS
L02-L44	HS/FS	0,0403	0,175	HS	0,014	HS
L03-L27	HS/FS	0,0293	0,204	HS	1,000	HS
L03-L29	HS/FS	0,0405	0,197	HS	1,000	HS
L03-L30	HS/FS	0,1188	0,309	HS	0,099	HS
L03-L31	HS/FS	0,0221	0,068	HS	1,000	HS
L03-L33	HS/FS	0,0103	0,233	HS	0,997	HS
L03-L42	HS/FS	0,0421	0,250	HS	1,000	HS
L04-L07	HS/FS	0,0019	0,066	HS	1,000	HS
L04-L14	HS/FS	0,0105	0,221	HS	1,000	HS
L04-L15	HS/FS	0,0167	0,095	HS	1,000	HS
L04-L17	HS/FS	0,0534	0,293	HS	0,969	HS
L04-L20	HS/FS	0,0069	0,086	HS	1,000	HS
L04-L32	HS/FS	0,0109	0,133	HS	1,000	HS
L04-L40	HS/FS	0,0180	0,028	HS	1,000	HS
L04-L41	HS/FS	0,0573	0,223	HS	1,000	HS
L04-L46	HS/FS	0,0011	0,078	HS	1,000	HS
L05-L07	HS/FS	0,0954	0,228	HS	1,000	HS
L05-L15	HS/FS	0,0389	0,159	HS	1,000	HS
L05-L20	HS/FS	0,0000	-0,119	HS	1,000	HS

L05-L28	HS/FS	0,0159	0,207	HS	1,000	HS
L05-L33	HS/FS	0,0062	0,133	HS	0,003	HS
L05-L41	HS/FS	0,0002	-0,122	HS	1,000	HS
L06-L12	HS/FS	0,0061	0,128	HS	1,000	HS
L06-L25	HS/FS	0,0069	0,175	HS	0,013	HS
L06-L26	HS/FS	0,0224	0,185	HS	1,000	HS
L06-L29	HS/FS	0,0316	0,153	HS	1,000	HS
L06-L35	HS/FS	0,0133	0,190	HS	1,000	HS
L06-L36	HS/FS	0,0250	0,247	HS	0,929	HS
L06-L42	HS/FS	0,0030	-0,026	HS	0,904	HS
L07-L14	HS/FS	0,0036	0,129	HS	1,000	HS
L07-L17	HS/FS	0,0046	0,122	HS	0,969	HS
L07-L46	HS/FS	0,0044	0,127	HS	1,000	HS
L08-L09	HS/FS	0,0170	0,257	HS	0,002	HS
L08-L23	HS/FS	0,0060	0,292	HS	0,999	HS
L08-L31	HS/FS	0,0175	0,334	HS	1,000	HS
L08-L36	HS/FS	0,0455	0,328	HS	1,000	HS
L08-L42	HS/FS	0,0443	0,369	HS	0,025	HS
L08-L43	HS/FS	0,0704	0,363	HS	1,000	HS
L08-L46	HS/FS	0,0238	0,237	HS	0,999	HS
L09-L12	HS/FS	0,0054	0,206	HS	1,000	HS
L09-L13	HS/FS	0,0323	0,350	HS	1,000	HS
L09-L14	HS/FS	0,0275	0,288	HS	1,000	HS
L09-L22	HS/FS	0,0009	-0,025	HS	0,899	HS
L09-L31	HS/FS	0,0050	0,163	HS	0,002	HS
L09-L36	HS/FS	0,0855	0,350	HS	0,002	HS
L09-L43	HS/FS	0,0677	0,190	HS	0,998	HS
L10-L38	HS/FS	0,0762	0,353	HS	1,000	HS
L10-L40	HS/FS	0,0090	0,102	HS	1,000	HS
L11-L13	HS/FS	0,0130	0,095	HS	0,999	HS
L11-L22	HS/FS	0,0087	0,141	HS	1,000	HS
L11-L30	HS/FS	0,0009	-0,034	HS	0,999	HS
L12-L13	HS/FS	0,0157	0,191	HS	1,000	HS
L12-L14	HS/FS	0,0046	0,165	HS	1,000	HS
L12-L25	HS/FS	0,0031	0,219	HS	0,013	HS
L12-L29	HS/FS	0,0015	-0,033	HS	1,000	HS
L12-L35	HS/FS	0,0856	0,246	HS	1,000	HS
L12-L43	HS/FS	0,0005	0,082	HS	1,000	HS
L13-L14	HS/FS	0,0222	0,284	HS	1,000	HS
L13-L30	HS/FS	0,1158	0,391	HS	1,000	HS
L13-L43	HS/FS	0,0325	0,282	HS	1,000	HS
L14-L15	HS/FS	0,0070	0,095	HS	1,000	HS
L14-L17	HS/FS	0,0000	0,068	HS	0,969	HS
L14-L20	HS/FS	0,0005	0,098	HS	1,000	HS
L14-L41	HS/FS	0,0000	0,065	HS	1,000	HS
L14-L43	HS/FS	0,0146	0,068	HS	1,000	HS

L14-L46	HS/FS	0,0356	0,224	HS	1,000	HS
L15-L17	HS/FS	0,0075	0,090	HS	0,969	HS
L15-L46	HS/FS	0,0047	0,114	HS	1,000	HS
L17-L20	HS/FS	0,0080	0,091	HS	0,969	HS
L17-L37	HS/FS	0,0146	0,148	HS	0,006	HS
L17-L41	HS/FS	0,0121	0,054	HS	0,969	HS
L17-L46	HS/FS	0,0037	0,139	HS	0,969	HS
L19-L46	HS/FS	0,1477	0,190	HS	0,386	HS
L20-L46	HS/FS	0,0027	0,166	HS	1,000	HS
L22-L25	HS/FS	0,0131	0,197	HS	0,002	HS
L22-L37	HS/FS	0,1184	0,167	HS	0,020	HS
L23-L39	HS/FS	0,0302	0,314	HS	0,696	HS
L23-L42	HS/FS	0,0145	0,185	HS	0,025	HS
L23-L46	HS/FS	0,0308	0,349	HS	1,000	HS
L25-L26	HS/FS	0,0517	0,289	HS	0,013	HS
L25-L27	HS/FS	0,0286	0,257	HS	0,514	HS
L25-L29	HS/FS	0,0110	0,181	HS	0,013	HS
L25-L35	HS/FS	0,0105	0,136	HS	0,014	HS
L25-L37	HS/FS	0,0313	0,150	HS	0,795	HS
L25-L38	HS/FS	0,0007	0,133	HS	0,016	HS
L25-L44	HS/FS	0,3422	0,256	HS	0,162	HS
L26-L28	HS/FS	0,1114	0,320	HS	1,000	HS
L26-L29	HS/FS	0,0298	0,188	HS	1,000	HS
L26-L30	HS/FS	0,0016	0,078	HS	0,899	HS
L26-L35	HS/FS	0,1528	0,329	HS	0,034	HS
L26-L37	HS/FS	0,1650	0,339	HS	0,023	HS
L27-L33	HS/FS	0,0955	0,281	HS	0,991	HS
L27-L37	HS/FS	0,0202	0,215	HS	0,115	HS
L27-L42	HS/FS	0,1544	0,213	HS	1,000	HS
L28-L30	HS/FS	0,0191	0,237	HS	0,899	HS
L28-L35	HS/FS	0,0000	0,067	HS	0,966	HS
L28-L37	HS/FS	0,0416	0,177	HS	0,023	HS
L29-L31	HS/FS	0,0141	0,246	HS	1,000	HS
L29-L35	HS/FS	0,0815	0,305	HS	1,000	HS
L30-L35	HS/FS	0,0000	0,060	HS	0,900	HS
L31-L36	HS/FS	0,0330	0,387	HS	1,000	HS
L31-L43	HS/FS	0,0020	0,127	HS	1,000	HS
L32-L38	HS/FS	0,0043	0,211	HS	0,999	HS
L32-L40	HS/FS	0,0013	0,105	HS	1,000	HS
L33-L38	HS/FS	0,0060	0,151	HS	0,118	HS
L33-L39	HS/FS	0,0421	0,113	HS	0,652	HS
L33-L42	HS/FS	0,0319	0,247	HS	1,000	HS
L33-L46	HS/FS	0,0102	0,149	HS	0,520	HS
L36-L43	HS/FS	0,0474	0,352	HS	1,000	HS
L37-L44	HS/FS	0,0254	0,195	HS	0,822	HS
L39-L46	HS/FS	0,0061	0,142	HS	0,304	HS
L41-L46	HS/FS	0,0054	0,120	HS	1,000	HS

L42-L46	HS/FS	0,0375	0,268	HS	0,025	HS
L02-L32	FS/HS	0,0844	0,393	HS	0,999	ND
L02-L36	HS/FS	0,0400	0,412	HS	1,000	ND
L02-L38	HS/FS	0,0864	0,424	HS	1,000	ND
L07-L20	HS/FS	0,0200	0,147	FS	1,000	ND
L07-L41	HS/FS	0,0050	0,062	FS	1,000	ND
L12-L26	FS/HS	0,0490	0,386	HS	1,000	ND
L15-L41	HS/FS	0,0210	0,078	FS	1,000	ND
L16-L17	FS/HS	0,1044	0,254	HS	0,965	ND
L20-L41	HS/FS	0,0440	0,251	FS	1,000	ND
L26-L32	HS/FS	0,3079	0,225	ND	0,000	ND
L35-L44	HS/FS	0,2095	0,400	HS	0,041	ND
L36-L42	HS/FS	0,0672	0,386	HS	0,975	ND
L01-L19	UR/HS	0,0106	-0,177	HS	0,060	UR
L02-L19	UR/HS	0,0266	-0,068	HS	0,105	UR
L04-L19	UR/HS	0,0278	-0,114	HS	0,088	UR
L05-L19	UR/HS	0,0092	-0,130	HS	0,054	UR
L05-L39	UR/HS	0,1904	0,097	HS	0,025	UR
L06-L19	UR/HS	0,0267	-0,029	HS	0,105	UR
L06-L39	UR/HS	0,0251	0,006	HS	0,071	UR
L06-L44	UR/HS	0,0486	0,095	HS	0,060	UR
L07-L19	UR/HS	0,0239	-0,138	HS	0,088	UR
L08-L19	UR/HS	0,0470	0,042	HS	0,320	UR
L08-L33	UR/HS	0,0178	-0,023	HS	0,520	UR
L08-L39	UR/HS	0,0685	0,099	HS	0,305	UR
L09-L16	UR/HS	0,0239	0,034	HS	0,031	UR
L09-L19	UR/HS	0,0302	-0,048	HS	0,277	UR
L10-L19	UR/HS	0,0245	-0,118	HS	0,216	UR
L10-L33	UR/HS	0,0955	0,086	HS	0,118	UR
L11-L19	UR/HS	0,0109	-0,126	HS	0,060	UR
L12-L19	UR/HS	0,0121	-0,191	HS	0,273	UR
L12-L44	UR/HS	0,0955	0,004	HS	0,013	UR
L13-L19	UR/HS	0,0534	0,102	HS	0,332	UR
L14-L19	UR/HS	0,0495	0,071	HS	0,287	UR
L15-L19	UR/HS	0,0114	-0,159	HS	0,088	UR
L16-L19	UR/HS	0,0307	-0,088	HS	0,084	UR
L16-L37	UR/HS	0,0750	-0,007	HS	0,021	UR
L17-L19	UR/HS	0,0253	-0,068	HS	0,088	UR
L19-L20	UR/HS	0,0254	-0,036	HS	0,088	UR
L19-L23	UR/HS	0,0515	0,095	HS	0,496	UR
L19-L25	UR/HS	0,0103	-0,153	HS	0,017	UR
L19-L26	UR/HS	0,0087	-0,203	HS	0,082	UR
L19-L27	UR/HS	0,0104	-0,216	HS	0,009	UR
L19-L28	UR/HS	0,0495	0,106	HS	0,071	UR
L19-L30	UR/HS	0,0320	-0,055	HS	0,136	UR
L19-L31	UR/HS	0,0282	-0,006	HS	0,471	UR
L19-L33	UR/HS	0,0084	-0,228	HS	0,174	UR

L19-L35	UR/HS	0,0095	-0,138	HS	0,082	UR
L19-L36	UR/HS	0,0397	0,029	HS	0,576	UR
L19-L37	UR/HS	0,0112	-0,190	HS	0,008	UR
L19-L38	UR/HS	0,0272	-0,085	HS	0,112	UR
L19-L39	UR/HS	0,0084	-0,094	HS	0,200	UR
L19-L40	UR/HS	0,0238	-0,049	HS	0,105	UR
L19-L41	UR/HS	0,0554	-0,042	HS	0,088	UR
L19-L42	UR/HS	0,0099	-0,101	HS	0,102	UR
L19-L43	UR/HS	0,0462	0,071	HS	0,387	UR
L19-L44	UR/HS	0,0504	0,046	HS	0,018	UR
L22-L44	UR/HS	0,0348	0,072	HS	0,002	UR
L23-L33	UR/HS	0,2024	0,092	HS	0,520	UR
L25-L32	UR/HS	0,0364	0,052	HS	0,015	UR
L25-L39	UR/HS	0,0015	-0,048	HS	0,037	UR
L26-L44	UR/HS	0,0291	0,054	HS	0,013	UR
L27-L44	UR/HS	0,0067	-0,180	HS	0,356	UR
L28-L33	UR/HS	0,0049	-0,034	HS	0,003	UR
L28-L39	UR/HS	0,0008	-0,040	HS	0,025	UR
L29-L30	UR/HS	0,0022	-0,063	HS	0,099	UR
L29-L44	UR/HS	0,1167	0,121	HS	0,013	UR
L30-L31	UR/HS	0,0092	-0,085	HS	0,099	UR
L30-L39	UR/HS	0,0438	0,103	HS	0,002	UR
L32-L44	UR/HS	0,0495	-0,057	HS	0,013	UR
L35-L39	UR/HS	0,0338	0,118	HS	0,034	UR
L37-L39	UR/HS	0,0330	-0,015	HS	0,016	UR
L38-L44	UR/HS	0,0474	0,110	HS	0,014	UR
L39-L44	UR/HS	0,1095	0,100	HS	0,147	UR

---