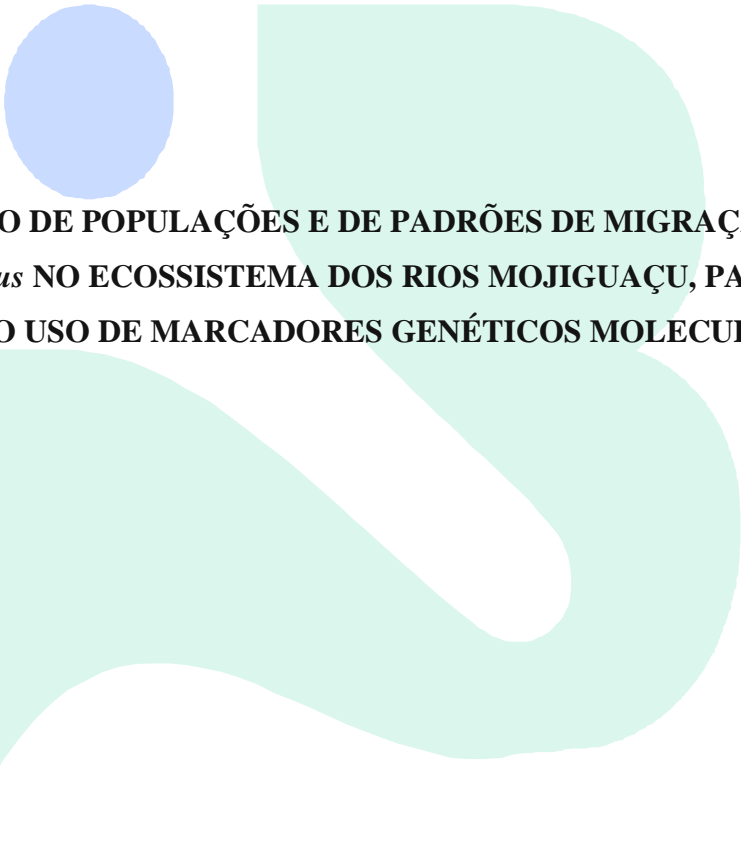


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Departamento de Morfologia
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Daniela José de Oliveira



**IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES E DE PADRÕES DE MIGRAÇÃO DE
Prochilodus lineatus NO ECOSISTEMA DOS RIOS MOJIGUAÇU, PARDO E
GRANDE COM O USO DE MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES**

BOTUCATU, SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Departamento de Morfologia
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES E DE PADRÕES DE MIGRAÇÃO DE
Prochilodus lineatus **NO ECOSISTEMA DOS RIOS MOJIGUAÇU, PARDO E**
GRANDE COM O USO DE MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Aluna: Daniela José de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-Orientador: Dr. Fernando Yuldi Ashikaga

BOTUCATU, SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliveira, Daniela José de.

Identificação de populações e de padrões de migração de *Prochilodus lineatus* no ecossistema dos rios Mojiguaçu, Pardo e Grande com o uso de marcadores genéticos moleculares / Daniela José de Oliveira. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Fernando Yuldi Ashikaga

Capes: 20204000

1. Peixe - Populações. 2. Peixe - Migração. 3. Mudança climática. 4. *Prochilodus lineatus*. 5. Marcadores genéticos.

Palavras-chave: ações antrópicas; alterações climáticas; curimatá; estrutura populacional.

Agradecimentos

A Deus por me permitir chegar até aqui, passar por todas as provações e seguir firme mesmo nas horas que desistir seria o mais fácil.

Ao meu orientador Professor Dr. Fausto Foresti, por sua paciência, confiança, oportunidade a mim concedidas e o privilégio de ser sua orientanda. Um exemplo de profissional.

Às agências de fomento CNPq, Capes e Fapesp, pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa.

A Ivana Felipe da Rosa, pela enorme colaboração em todas as etapas e processos desta tese. Sua amizade e auxílio serão lembradas eternamente. Muito obrigada.

Ao Dr. Fernando Yuldi Ashikaga, pela paciência, dedicação e pelos conhecimentos a mim transmitidos.

A toda equipe do CEPTA/ICMBio, pela infraestrutura, apoio e pela confiança em ceder todas as amostras de seu acervo biológico.

Ao Dr. José Augusto Senhorini e a Rita de Cássia G. A. Rocha, por compartilharem comigo seus conhecimentos de anos de pesquisa sobre a dinâmica de peixes migradores, viabilizando e fornecendo todas as condições necessárias para a execução desta tese.

Ao Professor Dr. Claudio de Oliveira, pelos conhecimentos a mim transmitidos.

A todos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes por dividirmos inúmeros momentos de aprendizado. Em especial a Silvana, Ivana, Natália, Sova, Cris, muito obrigada por cada momento com vocês divididos.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade e colaboração.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética) e a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/Botucatu.

A Seção de Pós Graduação, pelo auxílio em todas as etapas.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Peixes – CEPTA, por me acolherem sempre que necessário.

A minha família pelo apoio, carinho, dedicação e paciência em todos os momentos.

A você Zé Senhorini por estar comigo nos momentos alegres e difíceis. Obrigada por estarmos juntos, sempre.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos...

Resumo Geral

Entre as espécies de peixes migradoras Neotropicais que ocorrem na bacia do rio Paraná, *Prochilodus lineatus* é encontrada com abundância, principalmente no sistema composto pelos rios Grande, Pardo e Mojiguaçu. A espécie é popularmente conhecida como curimatá e é caracterizada por se organizar em grandes cardumes durante o processo de migração reprodutiva, bem como por possuir hábito alimentar onívoro e por ser muito apreciada por pescadores ribeirinhos. Foi a primeira espécie de peixe no Brasil a ter seu comportamento migrador estudado, servindo de referência para inúmeros outros estudos. O presente trabalho teve por objetivo identificar a dinâmica e os padrões de relacionamento das populações de *P. lineatus* na região de Cachoeira de Emas no rio Mojiguaçu, como modelo de manejo a ser aplicado na conservação de espécies migradoras. Para o desenvolvimento deste tema foram estabelecidas duas linhas básicas de estudo, sendo (1) a análise genético-temporal de populações de *P. lineatus* coletados em Cachoeira de Emas ao longo dos anos de 2003, 2005, 2006, 2009, 2010 e 2015 com o uso de marcadores moleculares dos tipos microssatélite e mitocondrial para identificar as possíveis mudanças estruturais e (2) identificar os padrões de organização dos cardumes migradores de *P. lineatus* durante os períodos reprodutivos de 2007 à 2010 na região de Cachoeira de Emas no rio Mojiguaçu. Os resultados obtidos nestas investigações revelaram a existência de alta variabilidade genética e estruturação temporal entre as populações estudadas e tais padrões de estruturação parecem estar altamente relacionados aos efeitos de pressões ambientais, sejam elas determinadas por fatores climáticos ou antrópicos.

Palavras-chave: curimatá, estrutura populacional, alterações climáticas, ações antrópicas.

Abstract

Among the species of Neotropical migratory fish that occur in the Paraná River basin, *Prochilodus lineatus* is abundantly found, mainly in the system composed by the rivers Grande, Pardo and Mojiguaçu. The species is popularly known as curimatá and is characterized by being organized in large schools during the process of reproductive migration, as well as by having an omnivore food habit and being highly appreciated by riverine fishermen. It was the first species of fish in Brazil to have its migratory behavior studied, serving as reference for numerous other studies. The present work had as objective to identify the dynamics and the relationship patterns of the populations of *P. lineatus* in the region of Cachoeira de Emas in the Mojiguaçu River, as a management model to be applied in the conservation of migratory fish species. For the development of this theme, two basic lines of study were established: (1) the genetic-temporal analysis of *P. lineatus* populations collected in Cachoeira de Emas throughout 2003, 2005, 2006, 2009, 2010 and 2015 with the use of molecular markers of the microsatellite and mitochondrial types to identify the possible structural changes and (2) to identify the patterns of organization of the migratory schools of *P. lineatus* during the reproductive periods from 2007 to 2010 in the region of Cachoeira de Emas on the Mojiguaçu river. The results obtained in these investigations revealed the existence of high genetic variability and temporal structure between the samples of the populations studied and such structuring patterns seem to be highly related to the effects of environmental pressures, whether determined by climatic or anthropogenic factors.

Key words: curimatá, population structure, climate change, anthropic actions.

Sumário

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1 Introdução Geral	1
Influências ambientais no ciclo de vida de peixes migradores	1
Ferramentas moleculares	2
O ecossistema formado pelos rios Mojiguaçu, Pardo e Grande	4
A espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	5
2 Objetivos	8
3 Resultados e Discussão	9
Capítulo 1	10
Resumo	10
Introdução	11
Material e Métodos	13
Resultados	15
Discussão e Conclusões	21
Capítulo 2	27
Resumo	27
Introdução	29
Material e Métodos	30
Resultados	36
Discussão	54
Conclusões	63
4 Considerações Gerais	65
5 Referências	67

1 Introdução Geral

Influências ambientais no ciclo de vida de peixes migradores

Ambientes de águas interiores sofrem com o aumento das ações antrópicas em todo o mundo (Goudie, 2018). Os habitats aquáticos associados a 65% do fluxo mundial de rios são moderadamente ou altamente ameaçados, principalmente pela alteração drástica de seus ecossistemas causados pela construção de barragens, poluição (Dudgeon, 2014; Knouft, e Ficklin, 2017) e mudanças no ciclo de chuva. Os peixes de água doce são um dos grupos de animais mais ameaçados, principalmente pelas alterações nos ciclos de chuva que se apresentam como um dos impactos mais severos das alterações climáticas, somando-se a uma ampla gama de estressores antropogênicos (Comte e Olden 2017).

Os ecossistemas de água doce em todo o mundo são particularmente vulneráveis aos impactos antropogênicos (Crook et al., 2015). Os seres humanos se apropriaram de mais de 50% da superfície de água doce disponível mundialmente (Iwasaki et al., 2012), o que tem resultado como contrapartida em fatores como poluição e desmatamentos que impactam e modificam os sistemas aquáticos (Dudgeon, 2014)

Aproximadamente um milhão de barragens atualmente fragmentam rios em todo mundo modificando seus fluxos aquáticos (Dudgeon, 2014). Em uma projeção feita para 2030, espera-se que grandes reservatórios deverão afetar 1,6 milhão de km de rios que ainda não foram fragmentados (Grill et al., 2015), alterando os padrões de biodiversidade dos ecossistemas locais. Os barramentos modificam os padrões e processos ecológicos dentro dos reservatórios, podendo ocasionar mudanças na composição das comunidades biológicas como resultado do desequilíbrio de algumas populações ou mesmo extinção de outras (De Bem, 2017)

Nas latitudes em que as flutuações sazonais na temperatura são pequenas, as cheias dos rios se constituem no principal gatilho para a reprodução de várias espécies de peixes (Welcomme, 1985), sendo que a ausência de cheias ou sua redução limitam, ou até mesmo frustram o processo reprodutivo de muitas delas. Uma vez que a migração é uma resposta adaptativa a condições específicas, as mudanças ambientais (por exemplo, variações climáticas) potencialmente alteram as pressões seletivas sobre o comportamento do movimento. Assim, tais mudanças também podem interferir ou

interromper a capacidade de migração de uma espécie, podendo, em certos casos, levar à redução ou perda total do processo migratório. Contudo, ainda é muito restrita a compreensão sobre as previsões sobre a ocorrência de destes fenômenos (Shaw e Martins, 2016). Considera-se, pois, que caracterizar os movimentos e o comportamento dos animais facilita uma visão da ecologia de uma espécie, o que permite melhores práticas de manejo e conservação (Gillanders et al., 2015; Izzo et al., 2016).

De modo associado, ressalta-se a importância de sanar dúvidas relacionadas ao processo de reprodução, entre os quais compreender os mecanismos fundamentais que permitem que algumas espécies de peixes migrem grandes distâncias, quais os fatores que estimulam o comportamento migratório, bem como por que espécies ditas como “migradoras” apresentam grupos residentes (Cooke et al., 2008) e também como os indivíduos se agrupam para realizar os processos migratórios. Apesar do interesse que as espécies migradoras despertam há várias décadas e das pesquisas já realizadas, aspectos básicos do comportamento, ecologia e genética de várias delas ainda permanecem desconhecidos e estudados de maneira isolada. Portanto, a compreensão dos mecanismos migratórios sob um ponto de vista genético de uma espécie poderia fornecer informações sobre a base do processo de migração também em outros táxons (Dingle, 2006; Chapman et al., 2011).

Ferramentas moleculares

Apesar de muitos estudos sobre a migração de peixes terem sido realizados nos últimos 70 anos, na maior parte deles têm sido abordados principalmente dados ecológicos, fisiológicos e comportamentais (Agostinho et al., 2003; Cooke et al., 2008). Com os recentes avanços da biologia molecular, muitos marcadores genéticos foram desenvolvidos nos últimos anos e, dentre as aplicações destes marcadores, ressalta-se sua utilização nos estudos de genética de populações, fornecendo dados de variabilidade e estrutura genética populacional, taxas de fluxo gênico e números efetivos de machos e fêmeas nos complexos populacionais envolvidos nos processos de migração (Sivasundar et al., 2001).

O estudo da genética de peixes é relevante em diversas situações, sobretudo em relação aos processos reprodutivos, tendo papel fundamental na conservação de populações selvagens onde pode ser avaliado o impacto determinado por mudanças no

ambiente sobre as populações naturais de peixes (Purdom, 1993). Dentre os diversos marcadores moleculares existentes, os microssatélites, também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeats*) apresentam uma série de características desejáveis em estudos genéticos por serem altamente polimórficos e de herança codominante, ou seja, permitem a distinção entre genótipos homozigotos e heterozigotos, o que os torna, portanto, altamente informativos (Christiakov et al., 2006).

A grande aplicabilidade dos marcadores microssatélites em estudos com peixes vem sendo evidenciada primeiramente pela quantidade de artigos disponíveis na literatura referentes ao isolamento e caracterização desses marcadores nesse grupo (Sivansudar, 2001; Oliveira et al., 2015; Villanova et al., 2015; Mendes et al., 2016; Ariede et al., 2017; Machado et al., 2017). Trabalhos utilizando este marcador em peixes têm abordado aspectos da variabilidade genética, estrutura de populações com inferências sobre conservação e manejo de espécies, estudos de padrões de migração, diferenciação de estoques cultivados, evidências de introgressão genética, sistemas reprodutivos, efeitos de fragmentação de ambientes, relações filogenéticas entre táxons relacionados, entre outros (Matsumoto e Hilsdorf, 2009; Pereira et al., 2009; Hilsdorf et al., 2011; Barroca et al., 2012, Sanches et al., 2012, Melo et al., 2013, Ashikaga et al., 2015; Ribolli et al., 2017, Ferreira et al., 2017).

Outra metodologia que tem fornecido resultados importantes em pesquisas voltadas à genética de populações é o sequenciamento de segmentos específicos de DNA. Segundo Kocher e Stepien (1997), os fatos que justificam esta afirmação decorrem de que os nucleotídeos são a unidade básica de informação codificada nos organismos; de que é relativamente fácil extrair e incorporar informações sobre processos de evolução molecular nas análises e de que o potencial de informações de dados fornecido é significativo.

Dentre os marcadores que têm por base as sequências genômicas, os genes mitocondriais são os mais comumente utilizados em estudos populacionais. O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável entre diferentes táxons, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) em vertebrados a até 570kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). Apresenta-se altamente conservado nos animais, variando de 14 a 26kb (Billington e Hebert, 1991), sendo representado por dois genes que codificam RNAs ribossômicos (12S e 16S do rRNA), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNA) e 13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP. A molécula de mtDNA possui uma região

controle, de cerca de 1kb, rica em sequências AT e desprovida de genes, embora exerça importante papel no início da replicação do mtDNA e da transcrição do RNA. Esta região controle é conhecida como “*D-loop*” (*displacement loop*).

O interesse no estudo do mtDNA tem por base o fato de que este genoma apresenta uma série de particularidades importantes, como sua herança exclusivamente materna e sua presença nos organismos em número haploide, o que impede, ou torna muito raros os eventos de recombinação. Além disso possui um genoma compacto, com estrutura e organização simples, ausência de intróns, pseudogenes e elementos transponíveis, além de apresentar alta taxa de mutações (Lewin, 1994). Em razão disto, o mtDNA pode fornecer informações relacionadas à estrutura populacional, sendo capaz de distinguir populações geográficas com grande eficiência através da identificação dos haplótipos.

O ecossistema formado pelos rios Mojiguaçu, Pardo e Grande

A bacia hidrográfica do rio Mojiguaçu pertence à Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 9 (UGRHI 09) e abrange 38 municípios. Possui uma área de drenagem total de 17,460 km², sendo 2,650 km² localizados no Estado de Minas Gerais e 14,810 km² no Estado de São Paulo (Brigante e Espindola, 2003), com uma extensão de 320 km localizada na região sudoeste do estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo (IBGE, 1982).

A bacia do Alto Paraná constitui-se na região com a maior concentração de represamentos para fins de geração de energia elétrica do Brasil, respondendo por cerca de 70% de toda energia produzida no país. Seus afluentes de grande porte, rios Tietê, Paranapanema e Iguazu, bem como seus formadores, rios Grande e Paranaíba, encontram-se totalmente represados. O próprio rio Paraná, com uma extensão de 809 km no território brasileiro, ficou apenas com cerca de 200 km de trecho lótico livre após o completo enchimento do reservatório de Porto Primavera (Agostinho et al., 2007). As implicações adversas destes empreendimentos recaíram decisivamente sobre a fauna e flora das regiões inundadas e, de forma acentuada, sobre a ictiofauna, principalmente em relação às espécies de peixes migradores. A alteração na estrutura das comunidades de peixes, com o crescimento das populações de peixes sedentários e a redução ou mesmo eliminação das espécies migradoras, constitui fato comum a todos os represamentos (Paiva, 1982; Torloni, 1993; Cesp, 1998; Agostinho et al., 2007).

O ecossistema formado pelos rios Mojiguaçu, Pardo e Grande, é, sem dúvidas, um dos grandes contribuintes para a manutenção da biodiversidade da Bacia do Alto Paraná e as modificações ocorridas neste ecossistema acentuaram-se principalmente a partir da década de 50, em decorrência do aumento da densidade demográfica, pressionando a exploração de seus recursos naturais. Dentre os principais eventos que contribuíram para estas alterações ambientais podem ser destacados o uso do solo para a agricultura, o desmatamento ciliar, a destruição de lagoas marginais, o lançamento de efluentes urbanos e industriais e a construção dos grandes barramentos de rios para fins de geração de energia elétrica realizados no rio Grande, que excluíram significativa área do ecossistema original que compreendia os sistemas denominados rios-planícies de inundação (Junk, et al., 1989), que eram anteriormente utilizadas para a realização das migrações tróficas e reprodutivas das espécies reofílicas.

Segundo Barbieri et al. (2000), alguns dos fatores que têm contribuído para a sobrevivência e reprodução de várias espécies de peixes no rio Mojiguaçu incluem a quantidade significativa de lagoas marginais naturais, trechos de mata nativa preservados por Unidades de Conservação, a grande capacidade de depuração da água e os poucos represamentos ao longo do curso do rio. Em seu trecho médio, o rio Mojiguaçu apresenta uma extensa planície alagável, com mais de 90 lagoas marginais de dimensões variadas e diferentes graus de conectividade com o rio (Vieira e Verani 2000). Este trecho compreende a região de Cachoeira de Emas em Pirassununga e o município de Luis Antônio (SP), que tem sido fortemente estudado por diversos pesquisadores. Diferentemente do trecho médio, a região do alto rio Mojiguaçu, próxima à sub-bacia do rio do Peixe, onde a área desse estudo está localizada, carece de pesquisas mais atuais referentes à sua ictiofauna.

A espécie *Prochilodus lineatus*

Entre as numerosas espécies de peixes que ocorrem por toda a bacia do rio Paraná, a espécie *Prochilodus lineatus* (Fig. 1) é a de maior frequência neste ambiente, principalmente nos rios Grande, Pardo e Mojiguaçu (Godoy, 1975). Popularmente conhecido como curimbatá, é considerado um peixe de piracema que se organiza em grandes cardumes para realizar extensas migrações nos rios da bacia do rio Paraná na época de reprodução, tendo sido a primeira espécie a ter seu comportamento migratório estudado no Brasil (Godoy, 1975). Entretanto, tem sido observado que grupos de peixes

se mantêm o ano todo em algumas localidades sendo, assim, denominados de residentes.



Figura 1 – Exemplar de *Prochilodus lineatus* (Fonte: Senhorini e Arashiro, 2018)

Por ser uma espécie de ampla distribuição, formas do corpo diferentes são encontradas em diferentes habitats, tema este discutido por Cabrera e Cândida (1964), Vidal (1967) e Pignalberi Cordiviola e Yuan (1973), Sverlij et al. (1993) que encontraram contornos do corpo diferentes entre diferentes populações da espécie, com a variação aparentemente relacionada aos recursos bióticos e abióticos do habitat. No estudo realizado por Machado e Foresti (2012), os autores observaram a existência de um padrão morfométrico diferente nesta espécie entre os peixes migradores e residentes.

Observando características morfométricas, Toledo-Filho (1981) sugere que ocorre uma estruturação populacional definida nesta espécie indicando a possível existência de estoques geneticamente diferentes, embora a periodicidade migratória verificada por Godoy (1975) pudesse indicar uma uniformidade populacional. De modo geral, Toledo-Filho (1981) observou a ocorrência de cardumes precoces e cardumes tardios com relação ao processo migratório observado na Cachoeira de Emas durante o período de reprodução, além da presença de cardumes residentes, com permanência durante todo o ano neste local. O autor sugere que a aplicação de marcadores genéticos seria de extrema importância para o conhecimento e caracterização da estruturação populacional desta espécie.

Indivíduos adultos de *P. lineatus* geralmente migram rio acima durante a estação reprodutiva, que ocorre geralmente no período de novembro a fevereiro, deixando as áreas de alimentação, onde vivem durante a maior parte do ano, para locais mais apropriados para a reprodução (Godoy, 1975). Após o período reprodutivo, migram novamente rio abaixo rumo às áreas de alimentação, onde os cardumes permanecem até a próxima estação reprodutiva (Godoy 1975).

Os primeiros estudos de migração de peixes no Brasil foram publicados no final da década de 50 e utilizaram como modelo exemplares de *Prochilodus lineatus* coletados no Alto rio Paraná (Morais e Schubart, 1955; Godoy, 1959, 1967, 1975). Os resultados das informações obtidas com estes estudos foram suficientes para o autor estabelecer a existência de duas regiões prioritárias neste ecossistema, denominadas como “lar de reprodução”, situado no rio Mojiguaçu entre Cachoeira de Emas e Salto do Pinhal, ocupado pela espécie migradora durante o período de novembro a fevereiro (piracema) e “lar de alimentação”, situado na parte média do rio Grande, entre a Cachoeira de Marimondo e a barragem da Usina de Porto Colômbia, ocupado durante os meses de março a agosto (período de crescimento e engorda) (Godoy, 1975).

Segundo o mesmo autor, os peixes desta espécie formariam cardumes no período de agosto a setembro e iniciariam o processo de migração em direção aos rios Pardo e Mojiguaçu para efetuar a reprodução, sendo que vários cardumes se encontrariam no “lar de reprodução” durante este período. Após o processo reprodutivo, estes retornariam para o “lar de alimentação” e para as lagoas marginais localizadas ao longo de todo o ecossistema. Neste trabalho, Godoy ainda constatou que esta espécie migraria cerca de 1000 km na área entre as duas regiões mencionadas.

Em trabalho de marcação similar realizado por Agostinho et al. (2003) com esta mesma espécie no canal principal do rio Paraná, entre a barragem de Itaipu e a foz do rio Baía, foi identificada uma área de migração de apenas 450 km. Contudo, nos dois trabalhos citados (Godoy, 1975; Agostinho et al., 2003), os autores destacam uma correlação positiva entre o início e a duração da estação de cheia na planície alagável dos componentes fluviais do alto rio Paraná, com o recrutamento reprodutivo e a realização do processo migratório.

Do ecossistema original da bacia do alto Paraná restaram apenas alguns tributários com curso livre em extensão suficiente para a realização das migrações tróficas e reprodutivas de espécies de peixes migradores, como trechos propícios à manutenção da vida dos peixes reofílicos. Os rios Mojiguaçu e Pardo, dois afluentes importantes do rio

Grande, vêm sofrendo constantes impactos em seus ecossistemas provocados pela ação antrópica e recentemente estes rios sofreram acidentes ecológicos determinantes de expressiva mortandade de peixes em período reprodutivo.

A ampla distribuição desta espécie e sua representativa abundância em toda a bacia hidrográfica determina seu alto valor comercial para a pesca, tanto profissional como de subsistência, representando cerca de 50 a 90% da biomassa total de peixes capturados nas porções baixas do rio e nas regiões de inundação (Flecker, 1996). Segundo dados da Estatística de Pesca do IBAMA (2007), no ano de 2007 foram pescadas mais de 28 mil toneladas de curimatás (*Prochilodus*) que, junto com 17 mil toneladas de jaraquis (*Semaprochilodus*) da região amazônica, representam cerca de 20% de toda a pesca extrativa continental no país. Devido ao seu valor econômico e a sua fácil adaptação à criação e reprodução em cativeiro, esta espécie se apresenta altamente interessante para cultivo em pisciculturas (Godoy, 1975).

Estudos que permitam compreender como ocorrem os processos biológicos e quais são as implicações dos fatores ambientais na estabilidade da estrutura populacional de espécies de peixes, se tornam ferramentas necessárias e importantes para a conservação de espécies migradoras. Sendo que a espécie de peixe *P. lineatus* ainda possui importância pelo seu apelo econômico e social para populações ribeirinhas, que tem sua principal fonte de renda e alimentos oriundos da pesca desta espécie.

2 Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo identificar a dinâmica e os padrões de relacionamento das populações de *Prochilodus lineatus* do rio Mojiguaçu, na região de Cachoeira de Emas, como modelo de manejo para a conservação de espécies de peixes migradores.

Para responder a esta postulação foram estabelecidos objetivos específicos:

- a – Analisar amostras dos grupos de *Prochilodus lineatus* coletados no rio Mojiguaçu, em Cachoeira de Emas ao longo dos anos de 2003, 2005, 2006, 2009, 2010 e 2015 com o uso de marcadores moleculares nucleares e mitocondrial;
- b - Identificação dos padrões de organização dos cardumes migradores de *Prochilodus lineatus* durante os períodos reprodutivos de 2007 à 2010 na região de Cachoeira de Emas no rio Mojiguaçu, analisando a possibilidade de formação dos cardumes por

fatores como proximidade genética, tamanho dos indivíduos, por faixa etária e/ou pela maturação gonadal

3 Resultados e Discussão

As informações obtidas dos estudos ecológicos e moleculares efetuados nos estoques e populações do curimatá *Prochilodus lineatus* foram organizados na forma de artigos científicos, que são apresentados a seguir. As referências citadas no texto dos capítulos encontram-se relacionadas no final desta tese.

Capítulo 1

Flutuações na estrutura e variabilidade genética de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) ao longo do tempo no rio Mojiguaçu, São Paulo, Brasil

Capítulo 2

O fenômeno da migração de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) no rio Mojiguaçu, São Paulo, Brasil: aspectos genéticos e ecológicos

Capítulo 1

Flutuações na estrutura e variabilidade genética de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) ao longo do tempo no rio Mojiguaçu, São Paulo, Brasil

Resumo

Compreender a diversidade e estrutura genética em escala temporal em espécies de peixes de água doce colaboram para a identificação de alterações genéticas associadas aos efeitos de ações antrópicas e tornam possível a adoção de medidas de manejo para a conservação dos elementos do ecossistema. O curimatá (*Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836) é uma espécie de peixe migrador amplamente distribuída na bacia do rio Paraná, principalmente nos rios Grande, Pardo e Mojiguaçu, região esta que tem sofrido importante e crescente ação de mudanças ambientais. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi realizar uma análise genética temporal em populações de *P. lineatus* na região de Cachoeira de Emas (Rio Mojiguaçu), amostradas ao longo dos anos de 2003, 2005, 2006, 2009, 2010 e 2015. As análises compreenderam a utilização de sete loci microssatélites e o marcador mitocondrial *D-loop* para estabelecer a estruturação destas populações frente às modificações ambientais. Com base nos resultados obtidos foi possível constatar a existência de expressiva variabilidade genética em todos os grupos, com ambos os marcadores. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou inexistência de estruturação genética populacional entre as populações ($F_{ST} = -0,01$) para o marcador mitocondrial. No entanto, as análises com os microssatélites revelaram uma estruturação moderada entre os grupos ($F_{ST}: 0,11$). Apesar da espécie ainda apresentar alta variabilidade genética no ambiente em estudo, foi possível observar flutuações ao longo do tempo e a existência de estrutura com relação às populações nas amostras analisadas. As alterações decorrentes de acidentes ambientais e determinantes de altos eventos de mortalidade, bem como períodos de escassez de chuvas no ecossistema, entre outros fatores, podem ter resultado em alterações do ciclo reprodutivo da espécie, levando ao isolamento dessas populações ao longo do tempo.

Introdução

A genética de populações é o campo que estuda a distribuição e a abundância dos genótipos e alelos nas populações, os fatores que modulam suas frequências, bem como a relação entre o espaço genotípico e o espaço fenotípico (Rellstab et al., 2015). A variabilidade genética intra e interpopulacional é um parâmetro fundamental na biologia evolutiva e no que se refere à conservação das espécies, sendo que altos níveis de variação genética podem aumentar o potencial das populações em responder á seleção, acentuar a adaptação dentro de um habitat particular e também promover limites de colonização e distribuição, possibilitando a sobrevivência em uma grande variedade de ambientes (Leanne et al., 2017).

O uso de marcadores microssatélites tem sido amplamente utilizados nos estudos de genética de populações, fornecendo dados de variabilidade genética, taxas de fluxo gênico, números efetivos populacionais e avaliações da estrutura populacional que proporcionam um retrato genético das populações, fornecendo estimativas do grau de endogamia, diversidade genética e diferenciação entre os espécimes (Pelicice et al., 2015; Sanches e Galetti, 2017; Prodöhl et al., 2017, Ferreira et al., 2017). Tais marcadores também podem elucidar várias questões relativas à origem, sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas, seleção natural e eventos históricos das espécies e populações (Ribolli et al., 2017; Tillotson e Quinn, 2018).

Um dos focos principais para a genética da conservação é a compreensão dos fatores que influenciam na persistência dos índices de diversidade genética em pequenas populações devido às barreiras antropogênicas (Deiner et al., 2007). Sua importância reside na aptidão para delimitar áreas prioritárias para conservação (Ashikaga et al., 2015).

Devido às alterações ambientais globais, os processos de destruição e fragmentação de habitats estão em rápido crescimento e muitas populações naturais de diferentes organismos estão se tornando cada vez menores e mais isoladas (Haddad et al., 2015). Sabe-se que a perda da variabilidade genética, a diminuição do fluxo gênico e o aumento da estruturação populacional a longo prazo, limitam a capacidade de uma população manter-se frente às modificações do ambiente (Nieminem et al., 2017). Além disso, a estruturação populacional e o acúmulo de diferenças genéticas entre diferentes grupos podem levar a um isolamento reprodutivo, interrupção do fluxo gênico, à diminuição do tamanho efetivo populacional, ao aumento da endogamia e à erosão

genética, tornando estes grupos mais susceptíveis ao processo de extinção (Frankham et al., 2014).

Tendo em vista que os ecossistemas de água doce estão atualmente entre os ambientes naturais mais ameaçados por conta da crescente poluição, pela fragmentação ambiental devida à construção de barragens e pela pesca predatória, torna-se cada vez mais importante examinar fatores que influenciam na manutenção da diversidade genética e, portanto, possibilitar a identificação da probabilidade de persistência de pequenas populações (Strayer e Dudgeon 2010).

Espécies que apresentam comportamento migrador são mais suscetíveis a ações antrópicas, uma vez que a fragmentação ambiental imposta pela construção de barragens hidroelétricas geralmente impede ou dificulta seu processo reprodutivo (Nieminem et al., 2017). Dentre as principais espécies de peixes Neotropicais migradores, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) é de ocorrência característica da América do Sul, alcançando de 50 a 90% da biomassa total de peixes situados na bacia do rio Paraná (Flecker, 1996) e percorre longas distâncias para se reproduzir (Sivasundar et al., 2001; Antônio et al., 2007). No entanto, apesar desta notável abundância e ampla distribuição, as espécies pertencentes a este grupo de peixes são particularmente afetadas por várias barragens presentes em afluentes e em toda a extensão da bacia do rio Paraná (Agostinho et al., 2008).

Embora nas últimas décadas o foco principal de vários estudos populacionais tenha sido compreender a diversidade e estrutura genética das espécies de água doce, poucos têm se atentado às informações em escala temporal, sendo que através de múltiplas coletas ao longo do tempo é possível realizar o monitoramento de alterações genéticas associadas a efeitos das ações antrópicas (Bi et al., 2003; Schwartz et al., 2007; Ostberg et al., 2012, Glover et al., 2012). Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares como microssatélites e o sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial (*D-loop*) pode possibilitar a identificação e a quantificação da variabilidade genética presente em cada grupo, bem como estimar a distância genética entre eles, gerando dessa forma informações para a compreensão dos mecanismos evolutivos que interferem no processo de estruturação genética populacional. Tais informações podem, então, determinar estratégias conservacionistas para a espécie (Dowling et al., 2015). Estudos que exploram as forças que moldam a estrutura genética em populações selvagens têm confiado em comparações espaciais entre populações, ou

em estudos temporais frequentemente de curta duração, muitas vezes com apenas duas ou três jornadas de coleta de amostras (Frankham et al., 2002).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo identificar as possíveis mudanças nas populações de *Prochilodus lineatus* coletados em Cachoeira de Emas entre os anos de 2003 a 2015 por meio de uma análise genética temporal, utilizando marcadores moleculares dos tipos mitocondriais e de microssatélites.

Material e Métodos

As amostras utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental - CEPTA, vinculado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. O CEPTA está localizado no município de Pirassununga, SP as margens do rio Mojiguaçu, possui um amplo banco de amostras biológicas oriundos de pesquisas realizadas na bacia desde 1960.

Local de estudo e amostragem

A área de estudo compreende a localidade de Cachoeira de Emas situada no rio Mojiguaçu, município de Pirassununga, São Paulo, Brasil, componente da bacia hidrográfica do rio Paraná. Amostras de indivíduos da espécie *P. lineatus* foram coletadas durante os anos 2003, 2005, 2006, 2009, 2010 e 2015 (Tabela 1), as quais foram preservadas em álcool 95% para posterior análise em laboratório. No total foram amostrados oito cardumes para desenvolver as análises genéticas com a utilização de marcadores microssatélites e de DNA mitocondrial.

Tabela 1: Numero amostral de cada coleta.

Mês amostrado	Número
Setembro de 2003	34
Janeiro de 2005	20
Agosto de 2005	37
Janeiro de 2006	36
Janeiro de 2009	30
Setembro de 2010	26
Fevereiro de 2015	23
Março de 2015	38
Total	244

O DNA genômico total foi obtido a partir de fragmentos de nadadeiras dos indivíduos capturados, com a utilização do protocolo proposto por Ivanova et al. (2006). A análise populacional foi feita em relação ao tempo, sendo que as amostras de fevereiro de 2015 e março de 2015 foram consideradas componentes do mesmo grupo, enquanto as demais amostras foram analisadas como grupos independentes.

Análises Moleculares

Microsatélites

Foram utilizadas 244 amostras obtidas em oito coletas e analisadas através de sete loci microsatélites, sendo seis espécie-específicos e descritos anteriormente para *P. lineatus*, PL3, PL9, PL14, PL119, PL139 e PL216 (Rueda et al., 2011) e um por amplificação heteróloga AG72, para *Leporinus macrocephalus* descrito por Morelli et al. (2007). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems) e seus produtos foram genotipados em sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems), segundo a metodologia proposta por Schuelke (2000). Ambos os primers foram marcados com fluorescências FAM e HEX.

Para as análises de diversidade genética com os marcadores microsatélites foi utilizado o programa Fstat v.2.9.3 (Goudet 2001), que permitiu a estimativa do número total de alelos por locus (N_a), número de alelos efetivos (N_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e a taxa de endogamia (F_{IS}).

Os eventuais desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e desequilíbrio de ligação foram identificados usando o programa Genepop v4.2 (Raymond e Rousset 2008). Neste software, os valores de significância de testes múltiplos foram ajustados considerando as correções de Bonferroni (Rice 1989).

Para estimar os níveis de estruturação populacional, foi utilizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992), com o teste de heterogeneidade genética espacial entre os grupos para ambos os marcadores utilizando o software Arlequin v.3.5.1.3 (Excoffier e Lischer 2010). Este programa possui algoritmos que permite calcular os índices de diferenciação genética (F_{ST}) entre e dentro dos grupos a partir de uma matriz de distância entre os haplótipos.

Com relação aos dados de microsatélite, o cálculo de F_{ST} e os valores de p, uma estimativa de R_{ST} , foram estimados usando o Fstat v.2.9.3 (Goudet 2001) e Arlequin

v.3.5.1.3 (Excoffier e Lischer 2010), respectivamente. Adicionalmente, foi estimada também a diferenciação genética pelo índice de Jost's (D'Jost) (Jost 2008).

Sequenciamento da Região Controle do DNA mitocondrial.

A reação de amplificação da região *D-loop* foi realizada utilizando um conjunto de primers descrito por Sivasundar et al. (2001) e utilizando a enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), conforme protocolo sugerido pelo fabricante. Fragmentos de aproximadamente 600 pb foram purificados e sequenciados em Sequenciador Automático modelo ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) com o kit BigDye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). Os fragmentos foram sequenciados em ambas as extremidades (*reverse* e *forward*) e suas sequências consenso foram geradas e alinhadas utilizando o software GENEIOUS 4.8.5 (Kearse et al., 2012). Ao todo foram sequenciadas amostras de 193 indivíduos obtidas ao longo do tempo de amostragem em oito coletas.

As estimativas de diversidade genética para o marcador mitocondrial (*D-loop*) foram realizadas pelo software DnaSP v.5.10.01 (Librado e Rozas 2009), gerando os índices de número de haplótipos, diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π) e número de sítios polimórficos.

Para as análises de expansão populacional foram utilizados os testes de neutralidade com base no modelo de Tajima D (Tajima, 1989) e FS de Fu (Fu, 1997). Estes testes buscam verificar a ocorrência de seleção em regiões do genoma para detectar expansão ou redução populacional recente (*bottleneck*) (Fu e Li, 1993; Tajima, 1996; Rand e Kann, 1998).

A análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada para estimar a heterogeneidade genética espacial entre os grupos, tendo sido utilizado o programa Arlequin v.3.5.1.3 (Excoffier e Lischer 2010).

Resultados

Microsatélites

O número de alelos (N_a) foi estimado para cada *locus* e para cada população amostrada (Tabela 2), sendo que as populações que apresentaram o maior número de

alelos foram os cardumes de setembro de 2003 e janeiro 2009, com os valores de 12 e 11,5, respectivamente. Os índices de diversidade gênica obtidos mostraram os menores valores nos anos de 2005 e 2010, respectivamente com os valores de 0,51 e 0,41 (Tabela 2).

Tabela 2: Dados de variabilidade genética de *P. lineatus* obtidos através de marcadores microssatélites. N: número de amostras; Na: número de alelos médios; Ne: número de alelos efetivos; Ho: heterozigosidade média observada; He: heterozigosidade média esperada; F_{IS} : índice de fixação Intrapopulacional.

	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	Diversidade Gênica
Set_03	29,14	12,00	8,05	0,53	0,74	0,24	0,60
Jan_05	14,57	6,71	3,40	0,45	0,59	0,21	0,51
Ago_05	31,71	10,29	5,56	0,56	0,70	0,20	0,61
Jan_06	29,00	8,29	4,64	0,42	0,65	0,33	0,67
Jan_09	23,57	11,57	7,07	0,58	0,77	0,17	0,62
Set_10	21,71	9,57	5,18	0,41	0,66	0,33	0,41
Fev_15	16,71	7,57	4,20	0,48	0,64	0,23	0,60
Mar_15	31,7	12,3	7,0	0,70	0,80	0,1	0,63

Ao longo dos anos coletados foi observada uma diminuição no número de alelos nas coletas dos anos de 2005 e 2015, com os menores valores observados em janeiro de 2005 (6,71) e fevereiro de 2015 (7,57).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado em 22 das 56 estimativas, considerando-se valores significantes de $P \leq 0,007$ após correção de Bonferroni. Assim, foi verificada significância de desvio em 34 estimativas (Tabela 3).

Tabela 3: Dados de variabilidade genética locus a locus. N: número de amostras; Na: número de alelos; Ne: número de alelos efetivos; Ho: heterozigossidade observada; He: heterozigossidade esperada; F_{IS} : Índice de Fixação Intrapopulacional; HWE: Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Set_03	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	HWE
AG72	29	9	4,95	0,45	0,80	0,44	*
PL03	34	7	2,68	0,38	0,63	0,39	*
PL14	18	12	6,42	0,56	0,84	0,34	Ns
PL09	31	3	1,91	0,58	0,48	-0,22	Ns
PL139	33	26	19,80	0,73	0,95	0,23	*
PL216	32	5	2,12	0,50	0,53	0,05	*
PL119	27	22	18,46	0,52	0,95	0,45	*
Jan_05	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	HWE
AG72	16	8	4,27	0,81	0,77	-0,06	Ns
PL03	16	7	2,56	0,69	0,61	-0,13	Ns
PL14	19	9	2,55	0,58	0,61	0,05	Ns
PL09	13	2	1,08	0,08	0,07	-0,04	Ns
PL139	16	13	8,13	0,69	0,88	0,22	Ns
PL216	11	4	1,97	0,27	0,49	0,45	Ns
PL119	11	4	3,27	0,00	0,69	1,00	*
Ago_05	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	HWE
AG72	23	11	5,34	0,43	0,81	0,47	*
PL03	31	5	1,88	0,13	0,47	0,72	*
PL14	34	7	3,78	0,88	0,74	-0,20	*
PL09	36	5	2,06	0,75	0,51	-0,46	ns
PL139	36	18	15,07	0,61	0,93	0,35	ns
PL216	29	5	2,07	0,24	0,52	0,53	*
PL119	33	21	8,75	0,88	0,89	0,01	ns
Jan_06	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	HWE
AG72	31	8	4,79	0,55	0,79	0,31	*
PL03	36	7	2,28	0,22	0,56	0,60	*
PL14	32	13	6,28	0,78	0,84	0,07	ns
PL09	20	2	1,22	0,20	0,18	-0,11	ns
PL139	35	19	11,09	0,66	0,91	0,28	*
PL216	27	3	1,93	0,19	0,48	0,61	*
PL119	22	6	4,86	0,36	0,79	0,54	*
Jan_09	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	HWE
AG72	20	17	12,90	0,60	0,92	0,35	*
PL03	28	9	3,83	0,43	0,74	0,42	*
PL14	30	10	2,70	0,93	0,63	-0,48	ns
PL09	16	3	2,11	0,94	0,53	-0,78	*
PL139	23	18	12,60	0,48	0,92	0,48	*
PL216	27	6	3,45	0,15	0,71	0,79	*
PL119	21	18	11,92	0,52	0,92	0,43	*
Set_10	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	HWE
AG72	22	8	3,84	0,50	0,74	0,32	*
PL03	24	5	2,06	0,42	0,51	0,19	ns
PL14	21	11	6,08	0,62	0,84	0,26	ns
PL09	25	2	1,04	0,04	0,04	-0,02	ns
PL139	19	16	10,78	0,47	0,91	0,48	*

PL216	20	19	8,79	0,55	0,89	0,38	*
PL119	21	6	3,68	0,24	0,73	0,67	*
Fev_15	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	HWE
AG72	15	6	3,69	0,47	0,73	0,36	*
PL03	17	7	2,51	0,47	0,60	0,22	ns
PL14	19	13	6,02	0,79	0,83	0,05	ns
PL09	18	3	1,63	0,50	0,39	-0,29	ns
PL139	19	15	11,28	0,68	0,91	0,25	ns
PL216	13	4	1,63	0,31	0,39	0,21	ns
PL119	16	5	2,67	0,13	0,63	0,80	*
Mar_15	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	HWE
AG72	19	9	3,50	0,63	0,71	0,12	*
PL03	36	11	4,15	0,50	0,76	0,34	*
PL14	34	10	3,78	0,74	0,74	0,00	*
PL09	32	3	2,16	0,94	0,54	-0,74	*
PL139	37	18	13,29	0,62	0,92	0,33	*
PL216	36	8	3,20	0,47	0,69	0,31	*
PL119	28	27	19,12	0,75	0,95	0,21	*
	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	
Média	24,8	9,8	5,64	0,51	0,69	0,22	
±	1,0	0,8	0,65	0,03	0,03	0,05	

*valores estatisticamente significativos $p \leq 0,007$.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou uma moderada estruturação genética populacional entre todos os grupos, sendo que os valores da estatística de F foram de 0,11, 0,27, 0,36 para os índices F_{ST} , F_{IS} e F_{IT} , respectivamente (Tabela 4), sendo que a maior fonte de variabilidade está presente dentro dos indivíduos (63,92%).

Tabela 4: Análise de Variância Molecular (AMOVA) de diferentes grupos de *P. lineatus*, utilizando marcadores microssatélites.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação	Estatística F'
Entre das populações	129,66	0,34	11,79	F_{ST} : 0,11*
Entre os indivíduos dentro das populações	651,50	0,70	24,28	F_{IS} : 0,27*
Dentro de indivíduos	367,0	1,84	63,92	F_{IT} : 0,36*
Total	1118,1	2,89		

*valores estatisticamente significativos $\leq 0,007$.

A análise par a par de F_{ST} e R_{ST} e D' Jost (Tabela 5) revelou diferenças moderadas na estrutura genética ao longo dos anos, sendo que a maior divergência observada foi identificada nas amostragens de setembro 2003, entre as coletas dos meses de janeiro 2005, janeiro de 2006 e março de 2015, ambos apresentando valores significativos com $p \leq 0,007$ e valores D' Jost: 0,62.

Tabela 5: Diferenciação genética par a par entre amostras de *Prochilodus lineatus* ao longo dos anos, obtidos através de marcadores microsatélites.

Grupo 1	Grupo 2	D' Jost	F_{ST}	R_{ST}
Set_03	Jan_05	0,62*	0,09*	0,30*
Set_03	Ago_05	0,61*	0,13*	0,08*
Set_03	Jan_06	0,62*	0,13*	0,29*
Set_03	Jan_09	0,60*	0,13*	0,12*
Set_03	Set_10	0,57*	0,08*	0,08*
Set_03	Fev_15	0,58*	0,08*	0,29*
Set_03	Mar_15	0,62*	0,12*	0,15*
Jan_05	Ago_05	0,30*	0,10*	0,50*
Jan_05	Jan_06	0,05	0,01	0,01
Jan_05	Jan_09	0,30*	0,06*	0,51*
Jan_05	Set_10	0,33*	0,14*	0,43*
Jan_05	Fev_15	0,05	0,02	0,06
Jan_05	Mar_15	0,44*	0,08*	0,31*
Ago_05	Jan_06	0,25*	0,06*	0,48*
Ago_05	Jan_09	0,25*	0,09*	0,28*
Ago_05	Set_10	0,45*	0,12*	0,23*
Ago_05	Fev_15	0,27*	0,05	0,50*
Ago_05	Mar_15	0,09*	0,02	0,07*
Jan_06	Jan_09	0,27*	0,06*	0,44*
Jan_06	Set_10	0,31*	0,11*	0,39*
Jan_06	Fev_15	0,03	0,00	0,00
Jan_06	Mar_15	0,38*	0,08*	0,29*
Jan_09	Set_10	0,47*	0,14*	0,30*
Jan_09	Fev_15	0,29*	0,04	0,41*
Jan_09	Mar_15	0,24*	0,07*	0,23*
Set_10	Mar_15	0,53*	0,11*	0,26*
Set_10	Fev_15	0,37*	0,11*	0,41*
Fev_15	Mar_15	0,39*	0,04*	0,29*

*valores estatisticamente significativos $p \leq 0,007$

DNA mitocondrial (D-loop)

As análises dos dados mitocondriais de *P. lineatus* revelaram 51 sítios polimórficos e 71 haplótipos. A diversidade haplotípica (h) variou de 0,94 a 0,98, enquanto a diversidade de nucleotídeos (π) variou de 0,08 a 0,12 (Tabela 6).

Tabela 6: Dados de variabilidade genética de diferentes grupos de *P. lineatus*, utilizando marcador mitocondrial *D-loop*.

	h	π	Sítios Polimórficos
Set_03	0,98	0,10	30
Jan_05	0,97	0,11	18
Ago_05	0,98	0,09	22
Jan_06	0,97	0,09	21
Jan_09	0,96	0,08	28
Set_10	0,94	0,08	27
Fev_15	0,97	0,12	27
Mar_15	0,96	0,09	35

*valores estatisticamente significativos ao nível de 5%.

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou inexistência de estrutura genética entre todos os grupos ($F_{ST} = 0,01$) e mostrou que a maior parte da variação molecular ocorreu dentro das populações (98,97) (Tabelas 7).

Tabela 7: Análise de Variância Molecular (AMOVA) de diferentes grupos de *P. lineatus*, utilizando marcador mitocondrial *D-loop*.

Fonte de Variação	d.f.	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação	Estatística F'
Entre das populações	6	19,47	0,02	1,03	$F_{ST}: 0,01$
Dentro das populações	186	477,62	2,56	98,97	
Total	192	497,10	2,59		

*valores estatisticamente significativos ao nível de 5%.

No entanto, o índice de F_{ST} par a par através do marcador *D-loop* (Tabela 8) revelou diferenças significativas nas coletas de 2005 e entre 2009, 2010 e 2015, com os valores de 0,11, 0,09 e 0,07, respectivamente.

Tabela 8: Análise de F_{ST} par a par de *P. lineatus* coletados ao longo dos anos de 2003 e 2015 obtidos com marcador *D-loop*.

	Set_03	Jan_05	Ago_05	Jan_06	Jan_09	Set_10	Mar_15
Set_03	*						
Jan_05	0,01	*					
Ago_05	0,00	0,05	*				
Jan_06	0,00	0,01	0,01	*			
Jan_09	0,01	0,11*	0,00	0,03*	*		
Set_10	0,01	0,09*	0,00	0,04	0,00		
Mar_15	0,00	0,07*	0,00	0,00	0,01	0,00	
Fev_15	0,00	0,00	0,02	0,00	0,05	0,05*	0,02

*valores estatisticamente significativos ao nível de 5%.

Expansão populacional

Os testes de Tajima e Fu foram maiores para as populações de setembro de 2003 e março de 2015 (Tabela 9)

Tabela 9: Teste de Tajima's e Fu's para *P. lineatus* ao longo do tempo através de marcador mitocondrial *D-loop*.

	Tajima's	Fu's
Set_03	-1,06*	-14,96*
Jan_05	0,16	-3,78*
Ago_05	-1,09	-9,36*
Jan_06	-0,71	-6,72*
Jan_09	-1,39	-10,46*
Set_10	-1,54	-8,5*
Fev_15	-0,68	-6,23*
Mar_15	-1,2	-17,76*

*valores estatisticamente significativos ao nível de 5%.

Discussão e Conclusões

Variabilidade Genética

Alterações nas populações podem ocorrer por meio de gargalos genéticos, seleção ou aumento da taxa de mutação, e podem afetar o crescimento populacional, a sustentabilidade e a adaptabilidade dos organismos. Neste estudo, foi avaliada a variação genética em sete locos de microssatélites em *P. lineatus* ao longo de 12 anos em oito amostragens realizadas no rio Mojiguaçu. Ao longo desse período amostrado,

os resultados indicaram dois eventos de redução e recuperação da diversidade genética. O primeiro pode ser observado por uma redução da diversidade genética entre setembro de 2003 e janeiro de 2005 ($N_a=12$; $N_a=6,7$) com recuperação subsequente em janeiro de 2009 ($N_a= 11,57$) e o segundo período, é observado em janeiro de 2009 à Fevereiro de 2015 ($N_a=11,57$; $N_a=7,57$), seguida de recuperação em março de 2015. Modificações deste tipo ocorrem em populações em declínio passando por deriva genética (Hutchinson, et al., 2003). Neste processo, alelos raros podem ser eliminados primeiro, e assim os alelos de alta frequência podem ser menos afetados. Dessa forma, com o passar do tempo, aumenta-se a frequência dos alelos comuns, o que pode promover o reestabelecimento desses alelos na população (Charlesworth e Willis 2009).

Em 34 das estimativas realizadas no presente trabalho, os valores de heterozigosidade observada (H_o) foram inferiores aos de heterozigosidade esperada (H_e) para todos os grupos, pelo qual os grupos agosto 2005 ($H_o= 0,56$; $H_e= 0,70$) e janeiro de 2009 ($H_o= 0,58$; $H_e= 0,77$) apresentaram diferenças maiores entre heterozigosidade observada e esperada. Os níveis de diversidade genética semelhantes e altamente variáveis aos obtidos neste estudo, também foram relatados para populações de *P. lineatus* de outras drenagens da bacia do rio Paraná, como nas seções intermediárias do rio Paraná ($H_o= 0,00-1,00$; $H_e= 0,10-0,64$) (Rueda et al., 2011., rio Grande ($H_o= 0,57-0,91$; $H_e= 0,58-0,81$). (Yazbeck e Kalapothaks 2007), rio Uruguai ($H_o= 0,63-0,73$; $H_e= 0,77-0,810$) (Rueda et al., 2013) e diferentes bacias do rio Paraná ($H_o= 0,634-0,82$; $H_e= 0,803-0,874$) (Ferreira 2017). De modo geral, altos índices de homozigotos são comuns em populações impactadas, sendo que até mesmo populações grandes são passíveis de restrição da variabilidade genética devido a ações antrópicas (Mastrochirico et al., 2018)

O Índice de Fixação Intrapopulacional F_{IS} é uma estimativa que permite quantificar a taxa de endogamia dentro do grupo (Chistiakov et al., 2006), divergências entre valores de H_e e H_o geram um valor positivo para o F_{IS} , evidenciando, assim, uma deficiência de heterozigotos nas populações, resultados estes diferentes aos observados por Ferreira et al., .2017) para a mesma espécie na bacia do rio Paraná ($F_{IS}= -0,04$ a $0,09$).

Em relação a diversidade gênica identificada através do *D-loop*, os menores índices foram dos anos de 2005 e 2010 com os valores de 0,51 e 0,41 respectivamente.

A diversidade de genes (h) variou de 0,94 a 0,98, enquanto a diversidade de nucleotídeos (π) variou de 0,08 a 0,12. Estes resultados de diversidade genética são semelhantes aos observados por Ferreira et al., (2017) para a mesma espécie em diferentes bacias do rio Paraná, pelo qual (h) variou de 0,97 a 1,00, enquanto (π) variou de 0,01 a 0,01.

Uma possível explicação para essas flutuações nos índices poderia estar relacionada à ocorrência de um desastre ambiental em pleno período reprodutivo ocorrido na bacia do complexo hidrográfico Mojiguaçu, Pardo e Grande, causado pelo derramamento de melão em 29 de setembro de 2003 no Rio Pardo, que resultou na mortandade de aproximadamente 200 mil toneladas de peixes, com possíveis reflexos negativos para o ecossistema nos anos seguintes. Um evento de modificação populacional causado por um dano ambiental é geralmente seguido por um aumento da taxa de endogamia e consequente redução da variabilidade genética nos estoques biológicos remanescentes (Faulk et al 2017).

Assim, em resposta a este evento é constatada uma diminuição na variabilidade genética em ambos os marcadores utilizados neste estudo. Como pode ser notado, a heterozigosidade observada, ou seja, a variabilidade genética estimada, diminuiu após o registro da mortalidade de peixes, que é seguida de aumento deste índice novamente após alguns anos.

Estrutura genética e expansão populacional

A aplicação dos testes AMOVA resultou na detecção de baixos valores de estruturação genética, em relação ao marcador *D-loop* e moderadas com relação ao marcador microssatélite, segundo uma escala proposta por Wright (Wright, 1951). Estes resultados sugerem que há uma estruturação temporal das populações coletadas sendo mais evidente entre os períodos de 2003/2005 e entre 2009/2010 no qual também é observado uma redução no número de alelos de um ano para outro.

A AMOVA realizada através dos loci microssatélites revelou a existência de uma estrutura genética entre as amostragens ao longo dos anos entre todos os grupos ($F_{ST} = 0,11$), embora em outros estudos, Henriques (2014) estimou um F_{ST} de 0,03 entre seus pontos coletados; e Ferreira et al. (2017) obteve F_{ST} de 0,01. Em outros estudos em Prochilodontidae, não foram observadas diferenças na estrutura genética

entre grupos de populações de *P. argenteus* ($F_{ST} = 0,007$), e *P. Costatus* ($F_{ST} = 0,008$), de lagoas marginais do rio São Francisco (Braga-Silva et al., 2016; Coimbra et al., 2017).

Os resultados obtidos através da análise de F_{ST} , R_{ST} e D' Jost para par do marcador microssatélite revelaram que os maiores níveis de estrutura genética foram obtidos entre janeiro de 2005 x setembro de 2010 ($F_{ST} = 0,14$; $R_{ST} = 0,43$; $D'_{Jost} = 0,33$), sendo que para o marcador mitocondrial os maiores índices foram observados em 2005 x 2009 ($F_{ST} = 0,11$) entre 2005 x 2010 ($F_{ST} = 0,09$), e entre 2005 e 2015 ($F_{ST} = 0,07$). Rueda e colaboradores (2013), em análise similar, detectaram variação sazonal na estrutura genético-populacional de *P. lineatus* no rio Uruguai (outono-inverno $F_{ST} = 0,14$ e outono-primavera $F_{ST} = 0,12$).

Em condições normais, sem eventos estocásticos, as diferenças genéticas entre os cardumes não seriam grandes o suficiente para estruturá-las em subpopulações (Machado e Foresti, 2012), sendo que para evidenciar diferenças na estrutura genética populacional foi necessário analisar grupos separados por um grande intervalo de tempo. Mesmo assim, houveram algumas divergências entre os marcadores analisados, sendo que a genotipagem de loci microssatélites gerou índices relativamente superiores de diferenciação genética aos estimados pelo sequenciamento da Região Controladora do DNA mitocondrial. Esse resultado pode ser explicado pelas diferenças existentes entre os padrões de funcionalidade dos marcadores, uma vez que os microssatélites apresentam maior taxa evolutiva em relação ao marcador mitocondrial *D-loop* (Schlötterer 2000).

Apesar da alta capacidade de locomoção para migração ao longo de todo um rio, espécies de peixes migradores Neotropicais de longa distância podem ser geneticamente estruturadas em uma única bacia hidrográfica, esse fato também é observado não apenas em *P. lineatus* (Rueda et al., 2013), mas também em *Salminus brasiliensis* (Ribolli et al., 2018). Ribolli e colaboradores (2018) obtiveram um valor de $D'_{Jost} = 0,18$, indicando dessa forma uma estruturação populacional temporal entre os grupos de indivíduos amostrados em anos consecutivos (2011 e 2012). Além disso, observaram, através da análise Bayesass 2, grupamentos genéticos distintos, coincidindo com as mesmas populações que apresentaram diferença genética

Dessa forma, embora detectadas flutuações genéticas, a recuperação da população deve-se, provavelmente, ao seu grande tamanho efetivo populacional e a sua alta variabilidade genética, favorecendo o reestabelecimento da população ao

longo dos anos. Ressalta-se que no ecossistema original da bacia do alto Paraná restaram apenas alguns tributários com curso livre em extensão suficiente para a realização das migrações tróficas e reprodutivas das espécies de peixes, com trechos propícios à manutenção da vida dos peixes reofílicos. Sendo assim, os rios Mojiguaçu e Pardo são fundamentais para a manutenção da variabilidade e de populações de *P. lineatus* e conseqüentemente de outras espécies.

Entretanto, esses rios vêm sofrendo constantes e crescentes agressões aos seus ecossistemas, provocados pela ação antrópica e pela ocorrência recente de acidentes ecológicos, determinantes de expressiva mortalidade de peixe em período reprodutivo. Este fato pode ser evidenciado entre os períodos de 2003 e 2005, oriunda da mortalidade de peixes no rio Pardo, ocasionada pelo derramamento de melão no ano de 2003.

Nesse sentido, este trabalho destaca a relevância do monitoramento genético de amostras ao longo do tempo, visto que essas informações tornam possível a avaliação de alterações genéticas associadas a efeitos antropogênicos (Schwartz et al., 2007; Allendorf 2017) permitindo gerir de forma mais adequada o manejo dessas populações.

Referências

As referências citadas no texto encontram-se relacionadas no final da tese.

Capítulo 2

O fenômeno da migração de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) no rio Mojiguaçu, São Paulo, Brasil: aspectos genéticos e ecológicos

Resumo

O fenômeno da migração nos organismos é promovido tanto por características intrínsecas à espécie quanto por estímulos ambientais, de forma que a combinação destes fatores estimula o deslocamento dos indivíduos ao longo de um percurso. Para entender os mecanismos envolvidos no processo de migração dos peixes e mitigar os impactos humanos sobre estes organismos, é imprescindível a proposição de estudos interdisciplinares que combinem diferentes ferramentas próprias de áreas como comportamento, fisiologia, genética e biologia experimental, entre outras. O presente projeto teve como objetivo principal ampliar o conhecimento sobre o padrão de migração e a dinâmica das populações migradoras do curimatá *Prochilodus lineatus*, espécie de peixe comumente encontrado no ecossistema formado pelos rios Mojiguaçu, Pardo e Grande, com o uso de ferramentas moleculares e ecológicas. Análises genéticas realizadas com a utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélite e mitocondrial (*D-loop*) identificaram a existência de estrutura populacional ao longo do período de análise, principalmente entre os anos de 2009 e 2010. Os resultados demonstraram uma predominância de indivíduos mais velhos na composição dos estoques migradores e uma frequência menor de indivíduos maduros durante o período que apresentou maior distanciamento genético (2009 e 2010). Neste mesmo período foram detectadas modificações com relação à proporção de machos e fêmeas, sendo que nos primeiros anos amostrados foi observada uma frequência maior de fêmeas durante o ciclo reprodutivo. Contudo, neste período em que se obteve a maior variação da estrutura populacional, a quantidade de fêmeas foi menor. Os dados de captura e análise do período de migração foram associados com os dos índices pluviométricos da região, tendo sido verificado que nos anos de 2009 e 2010 o pico de chuva não foi atingido e não coincidiu com período de migração, que ocorreu de modo antecipado. Os diferentes fatores relacionados no presente

estudo ao padrão de migração permitem supor que alterações no regime de chuvas constituem o principal responsável pela sincronia do processo, permitindo que os peixes de idade intermediária tenham suas gônadas preparadas, sendo que os estímulos ambientais sucessivos dão prosseguimento para a finalização do ciclo. Assim, alterações que corram em qualquer etapa do processo migratório também determinam modificações nos tempos e estágios de maturação gonadal, fazendo com que o processo reprodutivo se processe em épocas diferentes e fora do defeso (proibição da pesca), tornando os estoques susceptíveis à pesca predatória. Consequentemente, tais modificações ambientais podem resultar na estruturação genética encontrada nas amostras de *P. lineatus* estudadas.

Introdução

A migração é um conjunto complexo de características fisiológicas, morfológicas e comportamentais que atuam em conjunto com estímulos ambientais promovendo o deslocamento de animais ao longo de grandes distâncias (Dingle, 2006; Dingle e Drake, 2007, Cooke et al., 2008), atendendo a diferentes objetivos biológicos como alimentação e reprodução, entre outros. As migrações podem ter influências profundas nos ecossistemas, exigindo uma melhor compreensão de como e por que os animais se movem em determinadas épocas (Harsch et al., 2017). Tais fenômenos representam o conjunto de uma série de movimentos sequenciais, tanto em menor distância ou sozinhos, como a escolha minuto a minuto para deslocamentos diários, que, por sua vez, somam trajetórias mensais e sazonais, tornando-se movimentos mais alinhados a outros indivíduos e culminando a um processo de migração anual (Börger, 2016).

A migração geralmente permite que uma população atinja números maiores do que seria possível em uma população sedentária (Pulido e Berthold, 2003). Os migradores também desempenham um papel importante em muitos processos ecossistêmicos, uma vez que enquanto viajam entre locais, são capazes de transportar nutrientes, patógenos e parasitas, ligando habitats previamente não conectados (Bauer e Hoye, 2014). Dados esses laços, a perda de comportamento migratório em uma determinada espécie poderia determinar modificações mais amplas nas comunidades ecológicas (Mills, Soulé e Doak, 1993). Esta observação, por sua vez, sugere a importância de conservar a migração como um fenômeno, além de apenas conservar os organismos que migram (Wilcove e Wikelski, 2008). Compreender a dinâmica do movimento dos migradores durante todo o ciclo anual é fundamental para prever como as espécies respondem as mudanças antropogênicas e saber onde concentrar esforços de conservação (Bolger et al., 2008; Faaborg et al., 2010; Altizer et al., 2011).

Nas latitudes em que as flutuações sazonais na temperatura são pequenas, as cheias se constituem no principal gatilho para a reprodução de várias espécies de peixes (Welcomme, 1985), sendo que a ausência ou redução das cheias limitam ou até mesmo frustram o processo reprodutivo de muitas delas. Uma vez que a migração é uma resposta adaptativa a condições específicas, mudanças ambientais como variações climáticas potencialmente alteram as pressões seletivas sobre o comportamento do fenômeno. Tais mudanças também podem interferir ou interromper a capacidade de

migração de uma espécie e levar à redução ou perda total de do processo migratório; contudo, a ocorrência de tais alterações são de difícil previsão (Shaw e Martins, 2016). Dessa forma, caracterizar os movimentos e o comportamento dos animais facilita uma visão da ecologia de uma espécie, o que permite melhores práticas de manejo e conservação (Gillanders et al., 2015; Izzo et al., 2016).

Dentre as espécies de peixes migradores Neotropicais, *Prochilodus lineatus* é a de maior frequência, principalmente nos rios Grande, Pardo e Mojiguaçu (Godoy, 1975) localizados na bacia do Alto Paraná. Popularmente conhecido como curimatá, é considerado um peixe de piracema que se organiza em grandes cardumes para realizar extensas migrações nos rios desta bacia hidrográfica na época de reprodução, tendo sido a primeira espécie a ter seu comportamento migratório estudado no Brasil (Godoy, 1975).

Apesar do interesse que as espécies migradoras despertam há várias décadas e das pesquisas já realizadas, aspectos básicos do comportamento, ecologia e genética de várias delas ainda permanecem desconhecidos. Neste sentido, a compreensão dos mecanismos migratórios de uma espécie sob o ponto de vista genético poderia fornecer informações sobre a base do processo de migração também em outros táxons (Dingle, 2006; Chapman et al., 2011). Assim, ressalta-se a importância de sanar dúvidas relacionadas ao processo de reprodução, visando compreender os mecanismos fundamentais que permitem que algumas espécies de peixes migrem grandes distâncias, quais os fatores que estimulam o comportamento migratório, por que espécies ditas como “migradoras” apresentam grupos residentes (Cooke et al., 2008) e também identificar os mecanismos que determinam o agrupamento dos indivíduos para realizar os processos migratórios.

O presente estudo apresenta como objetivo principal a identificação dos padrões de organização dos cardumes migradores de *Prochilodus lineatus* durante os períodos reprodutivos de 2007 à 2010 na região de Cachoeira de Emas no rio Mojiguaçu, analisando a possibilidade de formação dos cardumes por fatores como proximidade genética, tamanho dos indivíduos, por faixa etária e/ou pela maturação gonadal.

Material e Métodos

Coleta do material biológico

Para a determinação dos padrões de migração de *P. lineatus* durante seu período de reprodução foram realizadas coletas mensais de exemplares na Cachoeira de Emas, município de Pirassununga - SP durante o período de fevereiro de 2007 a junho de 2011. Na captura dos exemplares foram usadas tarrafas de malha 8, 9, 10, 11 e 12 cm entre nós adjacentes, lançadas em diferentes pontos da Cachoeira de Emas. Em cada coleta foram capturados aproximadamente vinte indivíduos, que foram acondicionados em caixas resistentes de polipropileno e levados até o Laboratório de Genética e Reprodução de Peixes do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental CEPTA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, localizado às margens do rio Mojiguaçu, onde eram transferidos para tanques de alvenaria com circulação permanente da água.

Em laboratório, os exemplares foram anestesiados com mentol conforme descrito por Mendonça et al. (1993) e sacrificados mediante secção da coluna vertebral para posterior pesagem (g), medição do comprimento padrão (cm), retirada de 10 a 15 escamas da região anterior dorsal próxima ao opérculo e acima da linha lateral, determinação do sexo, pesagem das gônadas, classificação do estágio de maturação gonadal segundo a tabela de Godoy (1975) e coleta de fragmentos de tecido para análises moleculares.

Para a análise do padrão biométrico foi inferida uma média de cada grupo amostral. Após a obtenção destes dados de cada grupo foi aplicado o teste Kruskal Wallis a fim de identificar possíveis diferenças entre o peso e o tamanho dos indivíduos de cada cardume e, no caso da constatação de diferenças, foi aplicado o teste de Dun com nível de significância de 5%, sendo as análises realizadas pelo programa Statistic 7,0.

Análise genética

O DNA total foi obtido a partir de amostras de fragmentos de nadadeiras dos indivíduos capturados em cada período, utilizando-se o método de extração proposto por Ivanova et al. (2005). Para análise de estrutura populacional os cardumes foram agrupados em diferentes em duas simulações:

SIMULAÇÃO 1: Por período de migração, levando em consideração a reprodução dos peixes:

Migração de 2007 – setembro de 2007 à fevereiro 2008

Migração de 2008 – outubro de 2008 à janeiro 2009

Migração de 2009 – setembro de 2009 à dezembro de 2009

Migração de 2010 – setembro de 2010 à dezembro de 2010

SIMULAÇÃO 2: Por período de início, meio e final de cada período de migração.

Início	Meio	Final
Migracao07_Set	Migracao07_Nov	Migracao07_Fev
Migracao08_Out	Migracao07_Dez	Migracao08_Jan
Migracao09_Set	Migracao09_Nov	Migracao09_Dez
Migracao10_Set	Migracao10_Nov	Migracao10_Dez

Microsatélites

Para as análises de microsatélites foram utilizados seis *loci*, sendo quatro descritos no trabalho de Rueda et.al. (2011) (PL03, PL09, PL119, PL216) para *P. lineatus* e dois descritos por Morelli et al. (2007) (AG44 e AG72), sendo que os *primers* foram marcados com as fluorescências FAM e HEX.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em cinco corridas separadas para cada multiplex, de acordo com Beheregaray et al. (2004), utilizando-se *primers* específicos em cada multiplex e levando em consideração as características de cada marcador (Applied Biosystems, EUA). Para cada amostra foi utilizada a seguinte quantidade de reagentes: H₂O: 3.25 µl; dntps: 2.4 µl; tampão: 1.5 µl; Primers f: 0.2 µl; Primers r: 0.2 µl; mgcl₂: 0.75 µl; taq: 0.3 µl e dna: 1 µl. Formamida e *size standard* Rox (Applied Biosystems) foram combinados com o produto amplificado que foram submetidos à eletroforese por capilar utilizando-se um sequenciador automático da Applied Biosystems ABI 3130. Os perfis dos microsatélites foram analisados manualmente utilizando-se o programa GENEMAPPER 4.3 (Applied Biosystems).

O software Genalex 6,5 (Goudet, 1995) foi utilizado para a determinação do número total de alelos (Na), alelos efetivos (Ne) e para a conversão das matrizes utilizadas em outros programas. Para a detecção de possíveis erros de genotipagem, como *stutter*, *dropout* e alelos nulos foi utilizado o programa Microchecker 2,2,1 (van

Oosterhout et al., 2004)

O programa Arlequin (Excoffier e Lischer, 2010) foi utilizado para estimar a heterozigosidade esperada (H_e) e a heterozigosidade observada (H_o) (Nei, 1987). Os eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram verificados por teste exato. A magnitude do sinal de desvio em cada *locus* foi obtida através da estatística F_{IS} , sendo que os valores de significância de testes múltiplos foram também ajustados considerando a correção de Bonferroni ($P = 0,05/\text{número de combinações}$), para verificação do fator HWE.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) testa a heterogeneidade genética particionando a variância molecular em variância interpopulacional e variância Intrapopulacional, de acordo com estruturas populacionais definidas *a priori* (Excoffier et al., 1992, Excoffier et al., 2005). O programa Arlequin 3,01 utilizado para esta análise possui um algoritmo que calcula os valores estatísticos de Φ a partir de uma matriz de distância entre os haplótipos e que são análogos às estatísticas F de Wright (Excoffier et al., 2005, Wright 1951, 1965), sendo a significância estatística da F_{ST} determinada pelas permutações não-paramétricas, considerando-se 1000 permutações (Excoffier et al., 2005). Para a estimativa de diferenciação populacional foi realizado o teste de F_{ST} . Valores para o índice θ (Weir e Cockerham 1984), um análogo do F_{ST} de Wright (1951), foram estimados por alelo, por loco e pelo valor total utilizando o programa Fstat (Goudet, 1995).

DNA mitocondrial (D-loop)

Para a amplificação e sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial (*D-loop*) foram utilizados dois conjuntos de *primers*, sendo o primeiro para o sequenciamento, conforme relatado no trabalho de Sivasundar et al. (2001).

Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 0,8%. O DNA purificado foi sequenciado com o kit BigDye™ Terminator v3,1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), sendo o DNA sequenciado em um sequenciador automático de DNA modelo ABI 377. As sequências de DNA obtidas foram alinhadas usando-se o editor ClustalW (Thompson et al., 1997) acoplado ao programa Geneious 4.8.

Para inferir as relações entre os haplótipos foram utilizadas análises de máxima parcimônia (MP) com o Swofford (2002). Para a determinação do número de haplótipos

e de sítios segregantes, frequência e diversidade de haplótipos, assim como dos valores de diversidade nucleotídica e haplotípica do mtDNA, foi utilizado o programa DNAsp Sequence Polymorphism (Rozas et al., 2003). A rede de haplótipos foi criada com critério de parcimônia estatística, calculada pelo algoritmo *Median-Joining* utilizando o programa Network 4,6 (Bandelt et al., 1999).

Os testes de neutralidade Tajima D (Tajima, 1989) e FS de Fu (Fu, 1996) foram realizados com o uso do programa Arlequin 3.01 para verificar a existência de desvio na hipótese nula de neutralidade nas sequências da região controle do mtDNA (Excoffier et al., 2005). Estes testes foram desenvolvidos para verificar a ocorrência de seleção em regiões do genoma sendo que, se considerado um desvio significativo é possível detectar expansão ou redução (*bottleneck*) populacional recente (Fu e Li, 1993; Tajima, 1996; Rand e Kann, 1998).

Maturação gonadal e classificação etária

Os estágios de maturação gonadal desta espécie foram identificados segundo escala proposta por Godoy (1975) que permitiram a identificação macroscópica dos seguintes estádios: *Ovários (fêmeas)*: 0 – Imaturo; I – Repouso; II – Em Maturação; III – Parcialmente Maduro; IV – Maduro e nos *Testículos (machos)*: 0 – Imaturo; II – Em Maturação; III – Parcialmente Maduro; IV – Maduro; V – Esgotado.

Após serem removidas com o auxílio de uma pinça, as escamas foram separadas em envelopes de papel devidamente etiquetados com o número dos exemplares e a data de captura. Três escamas foram pré-selecionadas de cada amostra, descartando escamas assimétricas ou regeneradas de cada indivíduo e estas foram inicialmente imersas em solução de hipoclorito de sódio 20% por trinta segundos, seguindo-se imersão em solução contendo antifúngico Timol e lavagem em água destilada até serem totalmente limpas e apresentarem coloração perolada. As escamas foram, então, imersas em etanol absoluto para desidratar e remover possíveis resíduos de muco e no final do processo foram secas naturalmente sobre toalhas de papel, sendo então montadas entre duas lâminas de vidro devidamente etiquetadas. As lâminas montadas foram observadas em lupa óptica e a contagem dos anéis etários foi realizada visualmente (Orsi 2015, comunicação pessoal).

A idade dos exemplares foi estimada pelo método de anéis etários nas escamas (Fig. 2). Os exemplares cujo número de anéis nas escamas variaram de 0 a 1 são

considerados como pertencentes à classe etária I; com 1 anel mais crescimento marginal, à classe II e assim sucessivamente (Barbieri et al., 2000). A estrutura etária da população de curimatás foi obtida graficamente, plotando-se o número de indivíduos capturados em cada classe de idade.

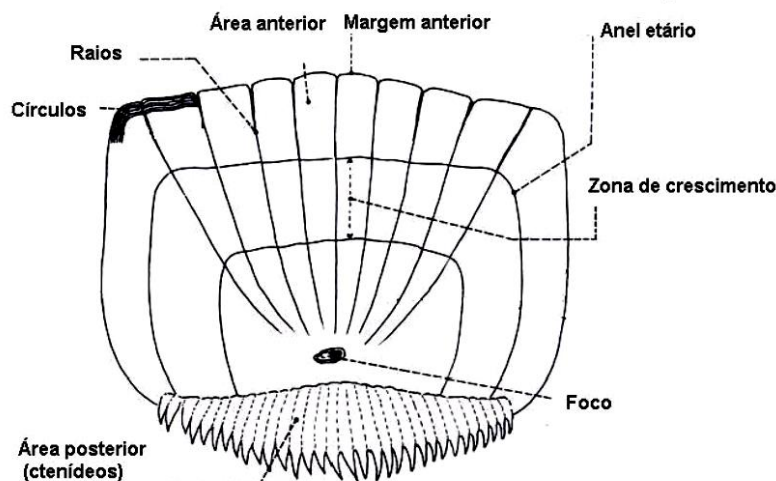


Figura 2 – Ilustração evidenciando a formação dos anéis etários. (Fonte: Barbieri et al., 2000).

Dados climatológicos

Os dados climatológicos utilizados no presente trabalho foram fornecidos pela Subdivisão de Climatologia e Arquivo Meteorológico (PBCA), da Subdiretoria de Pesquisa (SDP) do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA), visando atender à solicitação para fins de pesquisa contida no Ofício SEI nº 25/2017-CEPTA/DIBIO/ICMBio de 11 de julho de 2017. A estação meteorológica de superfície do Aeroporto de Pirassununga está localizada nas coordenadas 21° 59'S e 047° 20' W, numa altitude de 600 metros. As informações obtidas do Banco de Dados Climatológicos (BDC) foram registradas em formulários específicos e no Sistema Automatizado de Registro e Gerenciamento das Observações Meteorológicas – WEBMET.

A metodologia adotada consiste no levantamento e processamento das séries meteorológicas diárias e mensais de que abrangeram dados de temperatura mínima, média e máxima do ar em graus Celsius (°C) e de precipitação total em milímetros (mm).

Resultados

Microsatélites

Foram analisados 316 indivíduos de *P. lineatus* distribuídos em doze períodos amostrais (Tabela 1) com a utilização seis *loci* de microsatélites, sendo que apenas seis apresentaram dados suficientemente completos para serem analisados.

Diversidade e variabilidade genética

Todos os *loci* analisados se mostraram polimórficos e, em grande parte deles (66%), a heterozigosidade observada (H_o) apresentou valores inferiores ou próximos dos valores da heterozigosidade esperada (H_e) (Tabela 1).

Tabela 1 – Variabilidade genética de *P. lineatus* através de seis *loci* microsatélites utilizados nas análises. N = número de indivíduos; Na = número de alelos; H_o = heterozigosidade observada; H_e = heterozigosidade esperada; Fis = índice de fixação (endogamia).

Pop	N	Na	Ne	H_o	H_e	Fis
Migração07_Set	24,00±2,48	9,67±2,82	5,64±1,77	0,63±0,09	0,72±0,07	0,08±0,18
Migração07_Nov	19,50±1,31	9,17±2,86	6,36±2,34	0,60±0,07	0,71±0,08	0,08±0,17
Migração07_Dez	17,50±0,50	9,17±2,75	6,42±2,09	0,68±0,07	0,74/-0,07	0,04±0,16
Migração07_Fev	20,00±1,37	8,50±2,83	5,65±2,00	0,62±0,06	0,68±0,08	0,04±0,14
Migração08_Jan	25,17±2,34	7,50±2,74	5,31±2,43	0,52±0,06	0,64±0,09	0,10±0,16
Migração08_Out	22,67±1,69	8,00±2,46	4,86±1,58	0,48±0,06	0,64±0,10	0,16±0,17
Migração09_Set	30,67±1,09	7,83±2,54	4,80±1,97	0,53±0,07	0,63±0,09	0,10±0,15
Migração09_Nov	12,50±4,00	6,17±2,57	3,56±1,61	0,33±0,11	0,49±0,17	0,32±0,06
Migração09_Dez	22,67±1,65	7,83±2,24	4,30±1,16	0,40±-0,08	0,64±0,11	0,32±0,12
Migração10_Set	21,17±1,89	7,83±2,41	3,68±1,12	0,31±0,09	0,58±0,12	0,39±0,13
Migração10_Nov	22,17±2,15	9,00±2,54	5,57±2,03	0,61±0,15	0,70±0,08	0,17±0,20
Migração10_Dez	19,50±3,02	8,33±2,87	4,86±2,05	0,62±-0,14	0,59±0,13	-0,08±0,12
Total	21,46±0,76	8,25±0,71	5,08±0,51	0,53±0,03	0,65±0,03	0,14±0,04

A hipótese nula (H_0) de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aceita em 18 das 72 estimativas, considerando-se valores significantes de $P \leq 0,0083$ após correção de Bonferroni. Assim, foi verificada significância de desvio em 37 estimativas (Tabela 2).

O número de alelos (N_a) foi estimado para cada *locus* e para cada população amostrada, sendo que as populações que apresentaram o maior número de alelos foram

os cardumes de Migracao07_Dez, Migracao07_Nov, Migracao10_Nov, com os valores de 9,17, 9,17 e 9,0, respectivamente.

Tabela 2 – Variabilidade genética de seis *loci* microsatélites utilizados nas análises de cada grupo de *P. lineatus*. N = número de indivíduos; Na = número de alelos; Ho = heterozigosidade observada; He = heterozigosidade esperada; Fis= índice de fixação (endogamia); HWE = valores probabilísticos de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg;

Locus	N	Na	Ne	Ho	He	Fis	HWE
Migração07_Dez							
AG72	18,00	8,00	4,47	0,94	0,80	-0,22	0,1982
AG44	16,00	17,00	12,19	0,68	0,94	0,25	0,000*
PL119	19,00	18,00	13,62	0,55	0,94	0,38	0,000*
PL03	18,00	5,00	3,04	0,50	0,69	0,26	0,0879
PL09	18,00	2,00	1,91	0,77	0,48	-0,64	0,0143
PL216	16,00	5,00	3,30	0,56	0,71	0,19	0,2261
Migração07_Fev							
AG72	23,00	7,00	4,28	0,69	0,86	0,09	0,8628
AG44	14,00	15,00	10,32	0,78	0,93	0,13	0,0310
PL119	23,00	19,00	13,23	0,52	0,94	0,44	0,000*
PL03	21,00	5,00	2,27	0,52	0,57	0,06	0,6349
PL09	20,00	2,00	1,88	0,75	0,48	-0,60	0,007*
PL216	19,00	3,00	1,94	0,42	0,49	0,13	0,7476
Migração07_Nov							
AG72	21,00	6,00	3,96	0,66	0,76	0,11	0,2122
AG44	21,00	18,00	12,08	0,66	0,93	0,27	0,000*
PL119	20,00	18,00	15,09	0,65	0,95	0,30	0,000*
PL03	21,00	5,00	3,21	0,28	0,70	0,58	0,0002*
PL09	13,00	2,00	1,90	0,76	0,49	-0,63	0,0422
PL216	21,00	6,00	1,93	0,57	0,49	-0,18	0,5999
Migração07_Set							
AG72	29,00	11,00	5,13	0,76	0,81	0,06	0,4605
AG44	22,00	15,00	9,49	0,68	0,91	0,24	0,000*
PL119	29,00	20,00	12,37	0,76	0,93	0,17	0,003*
PL03	27,00	5,00	2,64	0,26	0,62	0,58	0,000*
PL09	13,00	2,00	1,95	0,85	0,50	-0,73	0,0237
PL216	24,00	5,00	2,29	0,46	0,58	0,19	0,2878
Migração08_Jan							
AG72	26,00	7,00	4,10	0,42	0,77	0,44	0*
AG44	14,00	9,00	5,09	0,78	0,83	0,02	0,3779
PL119	25,00	20,00	17,12	0,48	0,94	0,49	0,000*
PL03	30,00	5,00	2,25	0,33	0,56	0,40	0,007*
PL09	28,00	2,00	1,65	0,53	0,39	-0,37	0,1374
PL216	28,00	2,00	1,65	0,53	0,39	-0,37	0,1376
Migração08_Out							
AG72	26,00	8,00	4,74	0,65	0,80	0,17	0,002*
AG44	25,00	17,00	10,33	0,52	0,90	0,42	0,000*
PL119	16,00	13,00	8,83	0,44	0,91	0,51	0,000*
PL03	27,00	6,00	2,01	0,22	0,53	0,56	0,000*
PL09	21,00	2,00	1,63	0,52	0,39	-0,35	0,2424
PL216	21,00	2,00	1,63	0,52	0,39	-0,35	0,2618
Migração09_Dez							
AG72	25,00	9,00	4,92	0,64	0,81	0,20	0,1867
AG44	23,00	8,00	6,41	0,26	0,86	0,69	0,000*
PL119	22,00	18,00	8,57	0,63	0,90	0,28	0,000*
PL03	25,00	4,00	2,00	0,36	0,51	0,28	0,0809

PL09	26,00	3,00	1,26	0,23	0,21	-0,11	1,0000
PL216	15,00	5,00	2,63	0,26	0,64	0,57	0,001*
Migração09_Nov							
AG72	20,00	8,00	4,10	0,52	0,77	0,27	0,006*
AG44	16,00	7,00	4,92	0,37	0,82	0,53	0,000*
PL119	19,00	17,00	10,46	0,70	0,93	0,24	0,000*
PL03	20,00	5,00	1,84	0,36	0,47	0,23	0,4028
PL09	12,00	4,00	2,54	0,91	0,60	-0,51	-
PL216	21,00	6,00	1,93	0,19	0,48	0,60	-
Migração09_Set							
AG72	30,00	6,00	3,85	0,53	0,74	0,28	0,000*
AG44	26,00	12,00	4,97	0,73	0,81	0,09	0,4195
PL119	30,00	18,00	14,29	0,67	0,94	0,28	0,000*
PL03	32,00	7,00	2,52	0,25	0,63	0,59	0,000*
PL09	33,00	2,00	1,58	0,48	0,36	-0,32	0,1511
PL216	33,00	2,00	1,58	0,48	0,36	-0,32	0,1514
Migração10_Dez							
AG72	20,00	7,00	3,64	0,66	0,75	0,03	0,0945
AG44	22,00	20,00	14,67	0,86	0,95	0,07	0,0111
PL119	26,00	13,00	5,32	0,96	0,82	-0,18	0,2353
PL03	21,00	6,00	2,59	0,47	0,62	0,23	0,0826
PL09	23,00	3,00	1,93	0,73	0,49	-0,54	0,0115
PL216	17	6,00	2,54	0,23	0,60	0,61	-
Migração10_Nov							
AG72	23,00	9,00	5,81	0,76	0,83	0,05	0,1616
AG44	20,00	20,00	15,09	0,95	0,95	-0,02	0,000*
PL119	28,00	10,00	5,62	0,86	0,82	-0,09	0,6057
PL03	26,00	9,00	3,08	0,37	0,67	0,43	0,002*
PL09	23,00	3,00	1,93	0,65	0,49	-0,36	0,2661
PL216	13,00	3,00	1,86	-	0,48	1,00	0,000*
Migração10_Set							
AG72	22,00	8,00	3,84	0,50	0,75	0,32	0,000*
AG44	19,00	8,00	3,97	0,11	0,76	0,86	0,000*
PL119	20,00	19,00	8,79	0,55	0,90	0,38	0,000*
PL03	25,00	5,00	2,08	0,44	0,53	0,15	0,4203
PL09	27,00	2,00	1,04	0,04	0,04	-0,02	1,0000
PL216	14,00	5,00	2,35	0,21	0,59	0,63	0,001*

* = $P \leq 0,0083$ ajustados com a correção de Bonferroni.

O maior valor de diversidade genica encontrado foi para o cardume Migração07_Nov ($0,686 \pm 0,397$), enquanto o menor foi para Migração10_Set ($0,345 \pm 0,23$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Diversidade genética de cada cardume de *P. lineatus* através de seis marcadores microssatélites.

Cardume	Diversidade Genica
Migração07_Set	0,614463±0,359404
Migração07_Nov	0,686681±0,397155
Migração07_Fev	0,532979±0,320843
Migração07_Dez	0,613675±0,352111
Migração08_Out	0,424633±0,265952
Migração08_Jan	0,500452±0,303454
Migração09_Set	0,488263±0,287039
Migração09_Nov	0,591304±0,387149
Migração09_Dez	0,550528±0,328953
Migração10_Set	0,345455±0,239467
Migração10_Nov	0,524061±0,328914
Migração10_Dez	0,492208±0,299758

Os resultados de números de alelos também foram estimados por período de migração e por *locus*, sendo que o *locus* com maior número de alelos observado foi PL119 (Tabela 4), que apresentou 55 alelos. Já entre os períodos de migração, o ano de 2010 foi o que apresentou o maior polimorfismo (96 alelos), sendo totalizados 153 alelos diferentes para todos os grupos e todos os loci.

Tabela 4 - Total de alelos por locus e por período de migração de *P. lineatus*.

Período	AG72	AG44	PL119	PL03	PL09	PL216	Total
Migracao_2007	11	23	28	8	2	7	79
Migracao_2008	9	25	23	8	2	2	69
Migracao_2009	10	22	27	9	4	7	79
Migracao_2010	19	26	29	12	3	7	96
Total	24	42	55	14	5	13	153

O período de migração com maior valor de diversidade genica foi o de migração 2007, conforme relatado na Tabela 5, com o valor de 0,61±0,35, enquanto o menor foi o período de migração de 2008, que apresentou 0,41±0,27.

Tabela 5 – Diversidade genética dos períodos de migração de *P. lineatus* através de seis marcadores microssatélites.

	Diversidade genica
Migracao_2007	0,618914±0,357371
Migracao_2008	0,414671±0,272027
Migracao_2009	0,543794±0,321217
Migracao_2010	0,476819±0,288562

Estruturação genética

A análise de variância molecular (AMOVA) foi estimada em três simulações diferentes, conforme descritas a seguir.

A Tabela 6 mostra os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) onde é possível identificar que a maior fonte de variação está presente entre os indivíduos (64,85%). Esta simulação foi feita comparando-se os cardumes agrupados por período de migração (Migração 2007; Migração 2008; Migração 2009; Migração 2010) e o valor atribuído ao índice de fixação interpopulacional F_{ST} foi de 0,13, considerado moderado, indicou estruturação genética entre os períodos de migração.

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) para os diferentes períodos de *P. lineatus* através de marcadores microssatélites.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação	Estatística F
Entre populações	127,20	0,34	13,89	F_{ST} :0,13*
Entre os indivíduos das populações	698,26	0,52	21,24	F_{IS} :0,24*
Entre os indivíduos	424,0	1,61	64,85	F_{IT} :0,35*
Total	1249,47	2,49		

* considerando-se valores significantes de $P \leq 0,0083$

A Tabela 7 mostra os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) onde é possível identificar que a maior fonte de variação também está presente entre os indivíduos (67,08%). Esta simulação foi feita considerando-se cada cardume como uma população (Migração07_Set; Migração07_Nov; Migração07_Fev; Migração07_Dez; Migração08_out; Migração08_Jan; Migração09_Set; Migração09_Nov; Migração09_dez; Migração10_Set; Migração10_Nov; Migração10_Dez) e o valor atribuído ao índice de fixação interpopulacional F_{ST} : 0,05, foi considerado baixo, indicando que há uma pequena estruturação genética entre cardumes.

Tabela 7 - Análise de variância molecular (AMOVA) para os diferentes cardumes de *P. lineatus* através de marcadores microsatélites.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação	Estatística <i>F</i>
Entre populações	68,769	0,09300	5,48713	$F_{ST}: 0,05^*$
Entre os indivíduos das populações	544,537	0,46482	27,42608	$F_{IS}: 0,29^*$
Entre os indivíduos	313,500	1,13699	67,08680	$F_{IT}: 0,32^*$
Total	926,807	1,69480		

* considerando-se valores significantes de $P \leq 0,0083$

A última simulação foi de que os cardumes poderiam ter alguma relação com o início, meio e fim do período de migração, sendo então agrupados desta forma (Tabela 8). Tais estágios foram identificados através da determinação de maturação dos indivíduos em cada coleta.

Tabela 8 – Divisão dos cardumes coletados em etapas durante o período de migração

Início	Meio	Final
"Migracao07_Set"	"Migracao07_Nov"	"Migracao07_Fev"
"Migracao08_Out"	"Migracao07_Dez"	"Migracao08_Jan"
"Migracao09_Set"	"Migracao09_Nov"	"Migracao09_Dez"
"Migracao10_Set"	"Migracao10_Nov"	"Migracao10_Dez"

Assim como as duas outras simulações de agrupamentos, o AMOVA revelou que a maior fonte de variação está entre os indivíduos (66,57%) e que o F_{ST} é de 0,03207. Tal resultado não demonstra estruturação genética entre os grupos analisados (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise de variância molecular (AMOVA) para as diferentes etapas da migração de *P. lineatus obtidos* através de marcadores microsatélites.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação	Estatística <i>F</i>
Entre populações	29,72	0,077	3,20	$F_{ST}: 0,03^*$
Entre os indivíduos das populações	795,74	0,73	30,21	$F_{IS}: 0,31^*$
Entre os indivíduos	424,00	1,61	66,57	$F_{IT}: 0,33^*$
Total	1249,47	2,42		

* considerando-se valores significantes de $P \leq 0,0083$

O índice de diferenciação genética F_{ST} calculado entre os cardumes de migradores de *P. lineatus* para todos os *loci* apresentou valores baixos, sendo corroborados pela

análise do F_{ST} par a par (Tabela 10). Na relação apresentada é possível verificar que os valores de maior divergência obtidos entre os cardumes estão nas comparações entre Migracao10_Set x Migracao08_Jan (0,27) e Migracao10_Set x Migracao09_set (0,27), respectivamente. Contudo, os valores positivos que apresentaram estruturação, mesmo com valores baixos, apresentaram significância $P < 0,0083$.

Tabela 10 – Resultados das comparações de F_{ST} par a par entre os cardumes de *P. lineatus* amostrados utilizando seis *loci* microssatélites.

	Set_07	Nov_07	Dez_07	Fev_07	Out_08	Jan_08	Set_09	Nov_09	Dez_09	Set_10	Nov_10
Migração07_Set	0										
Migração07_Nov	0,002	0									
Migração07_Dez	-0,01	-0,01	0								
Migração07_Fev	-0,01	-0,02	-0,01	0							
Migração08_Out	0,03*	0,07*	0,08*	0,07*	0						
Migração08_Jan	0,07*	0,07*	0,12*	0,14*	-0,02	0					
Migração09_Set	0,10*	0,11*	0,15*	0,15*	0,02*	-0,01	0				
Migração09_Nov	0,04*	0,01*	-0,02	-0,02	-0,02	-0,04	-0,006	0			
Migração09_Dez	0,06*	0,06*	0,06*	0,05*	0,18*	0,20*	0,22*	-0,03	0		
Migração10_Set	0,08*	0,06*	0,07*	0,07*	0,24*	0,27*	0,27*	-0,01	0,008	0	
Migração10_Nov	0,07*	0,06*	0,07*	0,08*	0,13*	0,18*	0,20*	0,06*	0,10*	0,13*	0
Migração10_Dez	0,06*	0,07*	0,07*	0,07*	0,14*	0,18*	0,20*	0,04*	0,11*	0,14*	-0,002

* considerando-se valores significantes de $P \leq 0,0083$

Os resultados obtidos através do F_{ST} par a par foram significativos para todos os períodos de migração, sendo o maior valor obtido entre os períodos de migração de 2008 e 2010 (0,17060), considerado um valor elevado na diferenciação genética entre grupos (Tabela 11).

Tabela 11 - Resultados das comparações de F_{ST} par a par entre os períodos de migração de *P. lineatus* amostrados utilizando seis *loci* microssatélites.

	Migracao_2007	Migracao_2008	Migracao_2009
Migracao_2007	****		
Migracao_2008	0,08*	****	
Migracao_2009	0,05*	0,03*	****
Migracao_2010	0,04*	0,17*	0,08*

* considerando-se valores significantes de $P \leq 0,0083$

Na simulação onde é levado em consideração início, meio e final do período reprodutivo, não foi encontrado o mesmo panorama (Tabela 12), sendo que os valores

de F_{ST} par a par não mostraram indícios de estruturação genética entre grupos desta simulação.

Tabela 12 - Resultados das comparações de F_{ST} par a par entre os intervalos de migração início, meio e fim de *P. lineatus* amostrados utilizando seis loci microssatélites.

	Início	Meio	Final
Início	0,00		
Meio	0,02	0,00	
Final	0,01	-0,01	0,00

* considerando-se valores significantes de $P \leq 0,0083$

DNA mitocondrial (D-loop)

Variabilidade genética

Foram analisadas 217 amostras de *P. lineatus* com o uso do marcador mitocondrial (*D-loop*), tendo sido possível identificar 91 haplótipos diferentes. As diversidades genica e nucleotídica foram estimadas, sendo que todos os grupos analisados apresentaram altos valores de variabilidade genética. O cardume que apresentou maior valor para ambas estimativas foi o cardume de Migracao07_Fev, com os valores de $1,00 \pm 0,04$ para diversidade genética e $0,12 \pm 0,07$ para diversidade nucleotídica (Tabela 13).

Tabela 13 - Diversidade genica e nucleotídica de cardumes de *P. lineatus* obtidos através de marcador mitocondrial *D-loop*.

	Diversidade	
	gênica	nucleotídica
Migracao07_Set	$0,99 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,06$
Migracao07_Nov	$0,97 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,05$
Migracao07_Dez	$0,98 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,05$
Migracao07_Fev	$1,00 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,07$
Migracao08_Out	$0,96 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,05$
Migracao08_Jan	$0,97 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,05$
Migracao09_Set	$0,97 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,06$
Migracao09_Nov	$0,98 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,05$
Migracao09_Dez	$0,97 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,05$
Migracao10_Set	$0,95 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,05$
Migracao10_Nov	$0,98 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,05$
Migracao10_Dez	$0,83 \pm 0,22$	$0,06 \pm 0,05$

Estruturação genética

Assim como para os marcadores microssatélites, também para o marcador mitocondrial *D-loop* foram realizadas simulações com relação à análise de variância molecular (AMOVA).

A Tabela 14 mostra os resultados da análise (AMOVA) da primeira simulação entre os períodos de migração (Migração 2007; Migração 2008; Migração 2009 e Migração 2010) onde foi possível identificar que a maior fonte de variação está presente dentro das populações (99,33%) e o valor atribuído ao índice de fixação interpopulacional F_{ST} foi de 0,006 foi considerado baixo, com valor de $P > 0,05$ (não significativo).

Tabela 14 - Análise de variância molecular (AMOVA) nas diferentes etapas da migração de *P. lineatus* a partir de valores obtidos com o uso de marcador mitocondrial.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação	Fonte de variação	F_{ST}
Entre os grupos	3	10,50	0,009	0,32	0,006
Entre os grupos dentro das populações	8	23,80	0,009	0,35	
Dentro das populações	205	575,89	2,80	99,33	
Total	216	610,20	2,82		

valor de significância de $p < 0,05$

O índice de diferenciação genética F_{ST} par a par foi calculado entre os cardumes de migradores de *P. lineatus* (Tabela 15), porém apenas os cardumes de 2008 e 2009 apresentaram valores estatisticamente significativos, indicando ausência de estruturação genética populacional.

Tabela 15 - Resultados das comparações de F_{ST} par a par entre os períodos de migração de *P. lineatus* amostrados utilizando marcador *D-loop*.

	Migracao_2007	Migracao_2008	Migracao_2009
Migracao_2007	*		
Migracao_2008	-0,003	*	
Migracao_2009	0,007	0,021*	*
Migracao_2010	-0,006	0,002	0,0003

*valor de significância de $p < 0,05$

A Tabela 16 mostra os resultados da análise (AMOVA) entre os agrupamentos de início, meio e final de cada período de migração. É possível identificar que a maior

fonte de variação está presente dentro das populações (99,50%) e o valor atribuído ao índice de fixação interpopulacional F_{ST} foi de 0,00501, sendo considerado baixo, com valor de $P > 0,05$ (não significativo).

Tabela 16 - Análise de variância molecular (AMOVA) para início meio e final da migração de *P. lineatus* obtidos através de marcador mitocondrial.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação	Fonte de variação	F_{ST}
Entre os grupos	2	4,95	-0,01229	-0,44	0,00501
Entre os grupos dentro das populações	9	29,34	0,02643	0,94	
Dentro das populações	205	575,89	2,80925	99,50	
Total	216	610,20	2,82339		

*valor de significância de $p < 0,05$

Pelo índice de diferenciação genética de F_{ST} par a par entre os períodos de início, meio e final de migração de *P. lineatus* (Tabela 17), é possível verificar que as estimativas são estatisticamente não significativas e não indicam estruturação genética populacional entre início, meio e final do período reprodutivo.

Tabela 17 - Resultados das comparações de F_{ST} par a par entre os períodos de início, meio e final de migração de *P. lineatus* amostrados utilizando *D-loop*.

	Início	Meio	Final
Início	*		
Meio	0,001	*	
Final	-0,001	-0,004	*

*valor de significância de $p < 0,05$

O índice de diferenciação genética F_{ST} par a par foi estimado entre os cardumes migradores de *P. lineatus* (Tabela 18). Na relação apresentada é possível verificar que os valores de maior divergência obtidos estão nas comparações entre os cardumes Migracao10_Dez e Migracao09_Nov, com valor de 0,14361.

Tabela 18 – Resultados das comparações de F_{ST} par a par entre os cardumes de *P. lineatus* obtidos através do marcador mitocondrial *D-loop*.

	Set_07	Nov_07	Dez_07	Fev_07	Out_08	Jan_08	Set_09	Nov_09	Dez_09	Set_10	Nov_10
Migracao07_Set	∞										
Migracao07_Nov	0,01	∞									
Migracao07_Dez	0,04	-0,02	∞								
Migracao07_Fev	-0,03	-0,009	0,01	∞							
Migracao08_Out	0,02	0,01	0,004	-0,02	∞						
Migracao08_Jan	0,01	-0,02	-0,01	-0,01	-0,008	∞					
Migracao09_Set	0,002	-0,01	0,006	-0,01	-0,001	0,009	∞				
Migracao09_Nov	0,04	-0,01	-0,01	0,02	0,02	0,001	-0,003	∞			
Migracao09_Dez	0,03	-0,01	0,02	0,02	0,05	0,03	-0,002	-0,01	∞		
Migracao10_Set	0,02	-0,02	-0,02	-0,008	-0,01	-0,009	-0,003	-0,002	0,007		
Migracao10_Nov	-0,008	-0,001	0,01	-0,007	0,01	0,01	-0,02	0,0006	-0,006	-0,004	
Migracao10_Dez	0,009	0,07	0,07	0,06	0,10	0,03	0,09*	0,10*	0,14*	0,08	0,09

*valor de significância de $p < 0,05$

Classificação etária dos cardumes

Cada cardume teve seu padrão etário estimado e foi possível identificar que durante o período reprodutivo há predominância de indivíduos com classificação etária de 3 anos de idade, conforme relacionado na Figura 3. A classificação etária mostrou uma mudança ao longo dos anos, onde indivíduos mais novos foram encontrados em menor frequência nos anos seguintes a 2008, em detrimento dos indivíduos mais velhos.

A Tabela 19 apresenta os dados descritivos por período de migração e mostra que 48,18% dos indivíduos coletados durante este período correspondem à classificação etária 3, sendo que o menor valor encontrado foi para indivíduos entre as classes etárias 5 e 6.

Tabela 19 - Percentagem etária geral por período de migração de *P. lineatus*

Período	Classes etária						Total
	1	2	3	4	5	6	
Migração07	9,89%	45,05%	40,66%	4,40%	0,00%	0,00%	100,00%
Migração08	2,33%	18,60%	44,19%	27,91%	5,81%	1,16%	100,00%
Migração09	0,00%	9,68%	52,69%	32,26%	5,38%	0,00%	100,00%
Migração10	6,67%	20,00%	58,33%	15,00%	0,00%	0,00%	100,00%
Total Geral	4,55%	23,64%	48,18%	20,30%	3,03%	0,30%	100,00%

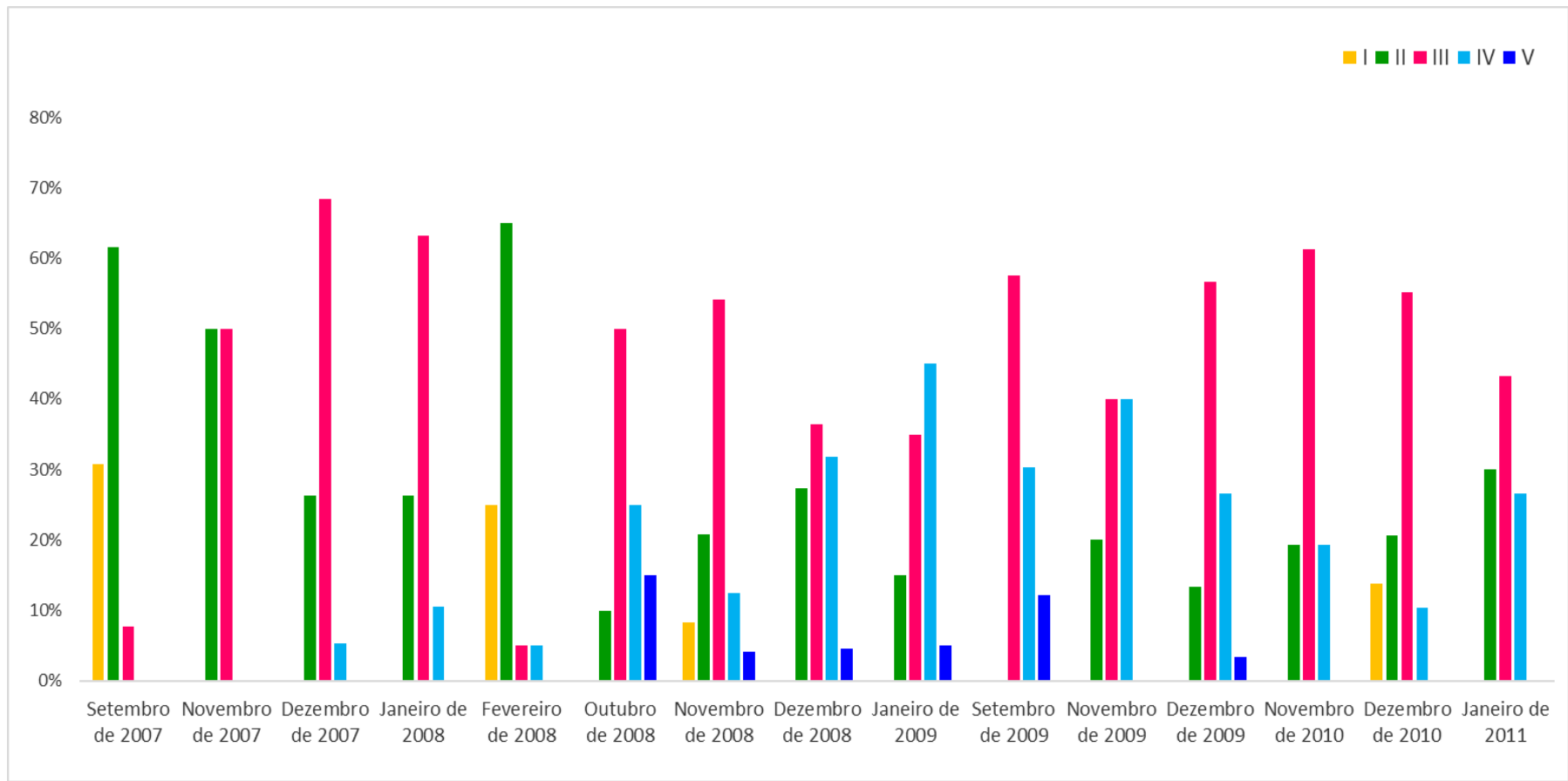


Figura 3 – Ilustração sobre a variação etária de *P. lineatus* durante os meses de migração reprodutiva da espécie. As cores representam cada uma das classes etárias (I, II, III, IV e V).

Análise Morfométrica

A análise estatística referente ao tamanho em centímetros dos indivíduos componentes dos diferentes cardumes analisados foi realizada a partir de dois protocolos, levando em consideração cada cardume coletado (Migração07_Set; Migração07_Nov; Migração07_Fev; Migração07_Dez; Migração08_out; Migração08_Jan; Migração09_Set; Migração09_Nov; Migração09_dez; Migração10_Set; Migração10_Nov; Migração10_Dez); e considerando os períodos de migração (Migração 2007; Migração 2008; Migração 2009 e Migração 2010).

Os resultados mostraram diferenças significativas entre o cardume de nov_09 e os cardumes de set_07, nov_07, fev_08 e set_09 (Tabela 20). Já na segunda simulação, o teste com os cardumes de migradores por período de migração mostraram-se não significativos.

Tabela 20 – Análise estatística de Krustal Wallis de tamanhos nos diferentes cardumes de *P. lineatus* capturados.

	set_07	nov_07	dez_07	fev_08	out_08	jan_09	set_09	nov_09	dez_09	set_10	nov_10
Migracao07_Set	∞										
Migracao07_Nov	ns	∞									
Migracao07_Dez	*	ns	∞								
Migracao07_Fev	ns	ns	ns	∞							
Migracao08_Out	ns	ns	ns	ns	∞						
Migracao08_Jan	ns	ns	ns	ns	ns	∞					
Migracao09_Set	ns	ns	ns	ns	ns	ns	∞				
Migracao09_Nov	*	*	ns	*	ns	ns	*	∞			
Migracao09_Dez	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	∞		
Migracao10_Set	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	∞	
Migracao10_Nov	*	*	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	∞
Migracao10_Dez	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Valor de significância para $p < 0,05$.

Correlação na frequência entre Machos e Fêmeas

Do total dos peixes coletados nos períodos de migração, 52,12% foram identificadas como fêmeas e 47,88% como machos (Tabela 21). O grupo de novembro de 2008 foi o que apresentou a maior porcentagem de fêmeas em relação aos outros

meses (75%) e o grupo de Setembro de 2009 foi o que apresentou maior porcentagem de machos (75,76%).

Tabela 21 – Proporção de machos e fêmeas entre os exemplares de *P. lineatus* coletados durante o período de migração.

	Fêmeas	Machos
Migração07	54,95%	45,05%
set	28,57%	71,43%
nov	72,22%	27,78%
dez	55,00%	45,00%
jan	68,42%	31,58%
fev	45,00%	55,00%
Migração08	60,47%	39,53%
out	45,00%	55,00%
nov	75,00%	25,00%
dez	59,09%	40,91%
jan	60,00%	40,00%
Migração09	46,24%	53,76%
set	24,24%	75,76%
nov	50,00%	50,00%
dez	66,67%	33,33%
Migração10	45,00%	55,00%
nov	32,26%	67,74%
dez	58,62%	41,38%
Total Geral	52,12%	47,88%

O teste de Person mostrou uma correlação positiva de 39% na proporção entre machos e fêmeas, com o valor de $p > 0,05$ refutando essa hipótese (Fig. 4).

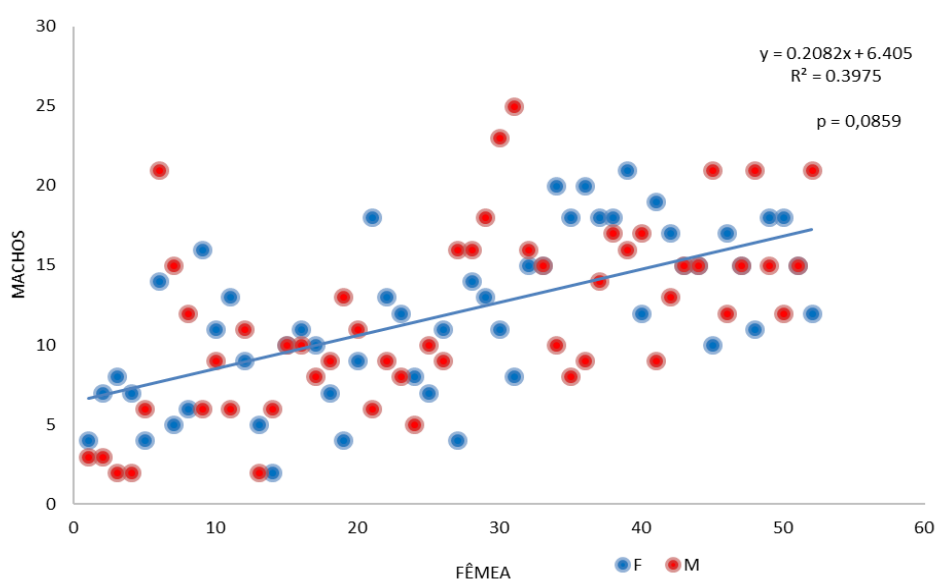


Figura 4 – Correlação de Person para testar a proporção de machos e fêmeas de *P. lineatus* nas amostras coletadas de 2007 a 2010 na Cachoeira de Emas.

Maturação gonadal

A maior porcentagem de indivíduos coletados durante o período de migração apresentou-se em estágio de desenvolvimento gonadal classificados como maduros (41,67%) (Tabela 22). Os exemplares componentes das amostras de indivíduos migradores do período de 2010 apresentaram o menor valor de indivíduos maduros durante o período reprodutivo (14,20%).

Tabela 22 – Estágio de maturação gonadal de indivíduos capturados durante o período de migração de *P. lineatus*.

	Imaturo	Em maturação	Parcialmente maduro	Maduro	Esgotado
Migradores 07	7,67%	5,82%	6,35%	55,03%	25,13%
Set	12,50%	16,67%	37,50%	33,33%	0,00%
Out	4,92%	3,28%	0,00%	91,80%	0,00%
Nov	0,00%	0,00%	0,00%	83,52%	16,48%
Dez	1,18%	0,00%	3,53%	42,35%	52,94%
Jan	12,73%	7,27%	0,00%	43,64%	36,36%
Fev	31,58%	21,05%	7,89%	0,00%	39,47%
Migradores 08	2,82%	0,00%	8,46%	71,47%	17,24%
Out	2,90%	0,00%	21,74%	75,36%	0,00%
Nov	0,00%	0,00%	3,06%	81,63%	15,31%
Dez	2,30%	0,00%	0,00%	68,97%	28,74%
Jan	7,69%	0,00%	13,85%	55,38%	23,08%
Migradores 09	4,94%	1,98%	34,81%	28,64%	29,63%
Set	6,90%	0,00%	93,10%	0,00%	0,00%
Out	5,56%	0,00%	63,33%	31,11%	0,00%
Nov	4,50%	0,00%	0,00%	68,47%	27,03%
Dez	3,42%	6,84%	2,56%	10,26%	76,92%
Migradores 10	6,80%	2,37%	64,79%	14,20%	11,83%
Set	3,61%	7,23%	83,13%	0,00%	6,02%
Out	3,45%	2,30%	79,31%	9,20%	5,75%
Nov	15,28%	0,00%	79,17%	5,56%	0,00%
Dez	6,25%	0,00%	25,00%	37,50%	31,25%
Total geral	5,63%	2,64%	28,54%	41,67%	21,53%

Apesar dos migradores de 2010 apresentarem um menor valor de indivíduos maduros, a observação dos dados resultantes da média geral revela que a espécie manteve seu ciclo reprodutivo ao longo dos anos (Fig. 5).

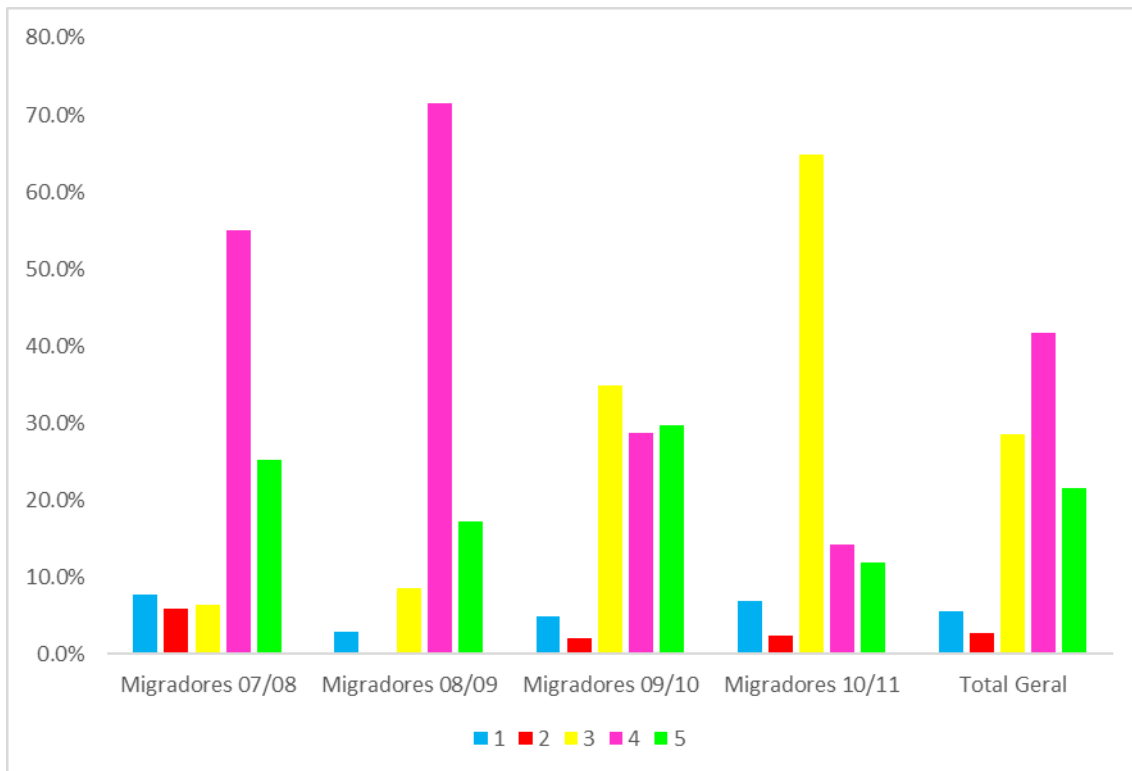


Figura 5 – Caracterização do estágio de maturação gonadal de *P. lineatus* durante os períodos de migração de 2007/2009, 2009/2010 e 2010/2011, As cores da figura representam os estágios gônadais identificados como imaturo (azul), em maturação (vermelho), parcialmente maduro (amarelo), maduro (rosa) e esgotado (verde).

Os períodos de migração de 2009 e 2010 apresentaram indivíduos em estágio maduro apenas por um mês, entre os exemplares capturados em dezembro (Fig. 6).

Os dados pluviométricos obtidos foram distribuídos ao longo do tempo e correlacionados com o período de migração de cada ano (Fig. 7).

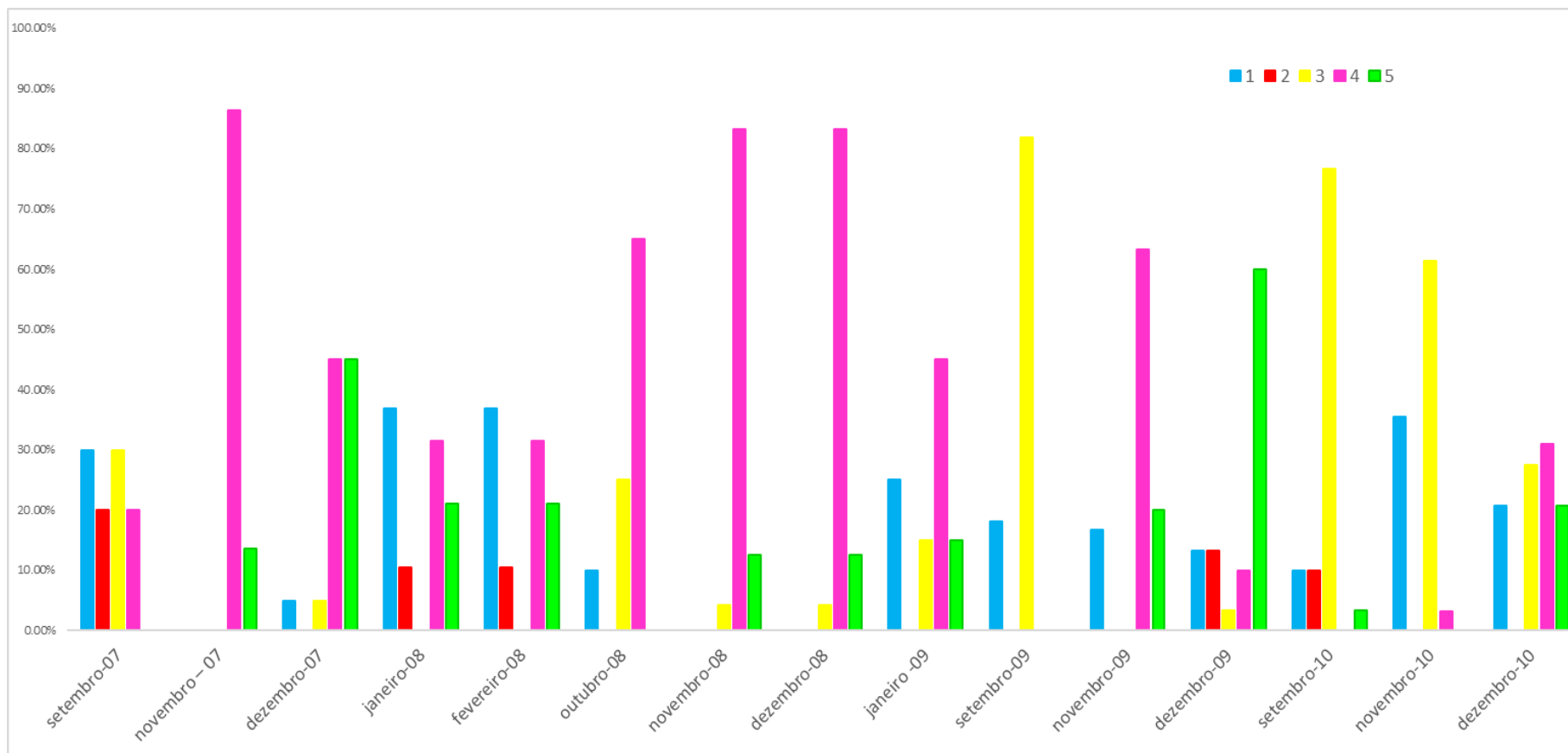


Figura 6 – Estágio de maturação gonadal ao longo dos períodos de migração de *P. lineatus*. As cores da figura representam os estágios gonadais identificados como imaturo (azul), em maturação (vermelho), parcialmente maduro (amarelo), maduro (rosa) e esgotado (verde).

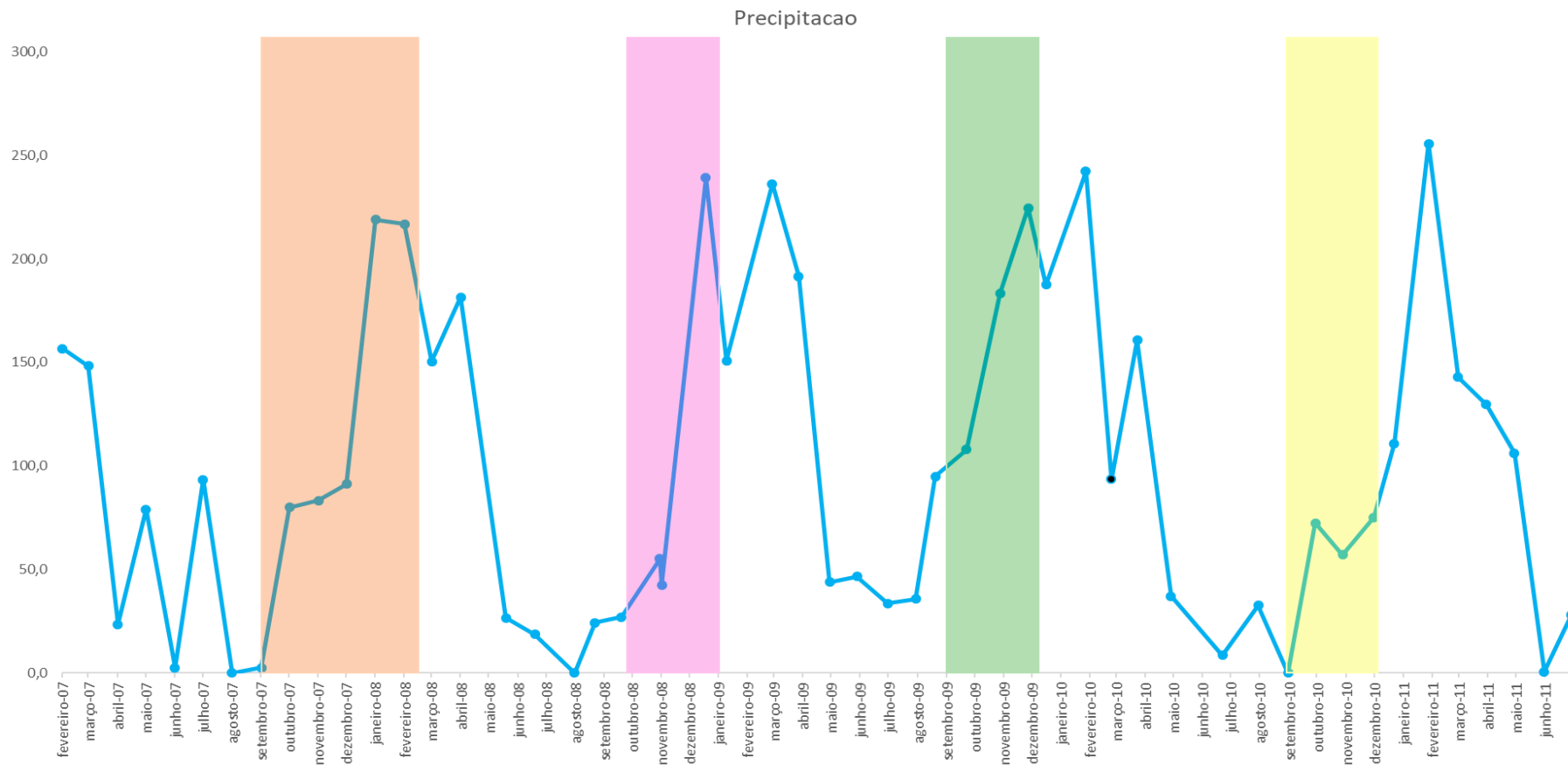


Figura 7 – Distribuição do período de migração ao longo do tempo e sincronia com período de chuva. A linha azul representa o volume de chuvas por mês, as faixas com as cores laranja, rosa, verde e amarelo representam os períodos de migração Migração 2007, Migração 2008, Migração 2009 e Migração 2010 respectivamente.

Discussão

Marcadores Microsatélites

As mudanças ambientais interferem de modo efetivo nos processos biológicos e, neste modo, podem afetar o desenvolvimento e a homeostasia dos peixes migradores, pois interrompem assim a correspondência entre o fenótipo de um indivíduo e o meio ambiente (Whitman e Agrawal, 2009), fazendo com que a persistência de uma espécie dependa, em última instância, da sua capacidade de mudar seu fenótipo através de respostas adaptativas. Assim, tanto entre as gerações quanto nas gerações, a variação adaptativa possibilita que os organismos resistam aos desafios ambientais (Meyers e Bull, 2002).

A aplicação de metodologias modernas e resolutivas tem possibilitado uma visão mais detalhada dos fenômenos biológicos e evolutivos, principalmente após a introdução e utilização de marcadores genéticos moleculares que permitem uma visão estrutural e funcional do genoma das espécies. No presente estudo a utilização de marcadores moleculares do tipo microsatélite possibilitou a identificação de 153 alelos distribuídos nos doze cardumes de *P. lineatus* analisados, a partir da amostragem de exemplares desta espécie coletados na Cachoeira de Emas, no rio Mojiguaçu durante o período de 2007 a 2010. Em estudo realizado com a mesma espécie Ferreira et al. (2017) identificaram 204 alelos em populações da bacia do rio Paraná e, assim como observado por estes autores, o locus PL119 apresentou o maior polimorfismo dentre os demais testados. O número médio de alelos estimados para os 6 loci microsatélites utilizados resultaram em uma média de 8,2 alelos, sendo este valor de $N_a=6,2$ superiores ao relatado por Henriques (2014) e inferiores aos relatados Perini (2013), com $N_a=7,6$ e Ferreira et al. (2017), com $N_a=15,8$ para *P. lineatus*. Já Melo et al. (2013), identificaram um valor médio de 9,6 alelos para *P. argenteus* da bacia do São Francisco.

Os índices de heterozigosidade esperada variaram de 0,21 a 0,95 e de heterozigosidade observada de 0,11 a 0,95, mostrando, portanto, uma grande variação, diferentemente dos dados encontrados por Perini (2013) que relataram variações de H_o entre 0,62 e 0,81. Tal variação nos valores de heterozigosidade encontrados poderia ser decorrente da amplitude temporal da amostragem utilizada, pois Perini (2013) fez coletas pontuais em diferentes locais em apenas um ciclo reprodutivo, ou ainda ser um

efeito da escolha dos loci, os quais apresentam níveis elevados de polimorfismo para esta espécie. Neste sentido deve ser considerado que os estudos da variabilidade genética tem sido realizado em diversas espécies de peixes utilizando diferentes classes de marcadores moleculares e os resultados obtidos têm indicado diferentes níveis de variabilidade entre os marcadores (Ashikaga et al., 2015; Ribolli et al., 2017; Ferreira et al., 2017; Allendorf, 2017; Hilsdorf e Hallerman 2017).

Embora a alta diversidade de alelos possa parecer uma ocorrência comum em diversas espécies de peixes Neotropicais, a deficiência de heterozigotos e os níveis significativos de endogamia encontrados nas populações aqui analisadas de *P. lineatus* sugerem a baixa ocorrência de eventos de inclusão de indivíduos provenientes de populações portadoras de diferentes frequências alélicas, conforme sugerido por Hartl e Clark (2007). Entretanto, esta baixa variabilidade não é normalmente encontrada em trabalhos com a espécie *P. lineatus* (Rueda et.al.,2013, Ferreira et al., 2017). Em 51 das estimativas realizadas no presente trabalho, os valores de heterozigosidade observada (H_o) foram inferiores aos de heterozigosidade esperada (H_e), gerando um valor positivo para o Índice de Fixação Intrapopulacional (F_{IS}) e evidenciando, assim, uma deficiência de heterozigotos nas amostras analisadas. A deficiência de heterozigotos é bastante comum ocorrer em populações de peixes e está associada geralmente a eventos de subdivisão populacional e endogamia (Taylor et al., 2015). Apesar de *P. lineatus* historicamente apresentar uma população grande, possíveis efeitos antrópicos como construções de barragens hidrelétricas e diminuição do tamanho efetivo populacional poderiam estar influenciando e modificando a dinâmica desta espécie neste ambiente. Ferreira et al. (2017) encontrou em 34% de sua amostragem déficit de heterozigotos para a espécie em estudo, resultado este divergente deste trabalho, onde o valor de déficit observado atingiu 68%. Porém, em investigação realizada na mesma localidade do presente estudo, Perini (2013) encontrou 100% de déficit de heterozigotos.

Nas análises foi constatado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em 38 das 72 estimativas realizadas, utilizando valores significantes de $P > 0,0083$ após correção de Bonferroni. A significância de desvio foi verificada em 34 das estimativas realizadas, mostrando que a maioria das populações (52%) está em equilíbrio. Para esta mesma espécie, Henriques (2014) encontrou desvios significativos de EHW em todas as populações e para todos os loci utilizados nas análises. Alguns fatores podem ser apontados como causa de desvios de EHW e, neste caso, estes poderiam estar associados ao alto número de alelos existente por locus, à ocorrência de alelos nulos,

efeitos de *stuttering* ou *dropout*, efeito Wahlund, seleção de alelos específicos e endocruzamento, conforme relatado por diferentes autores (Perini, 2013; Henriques, 2014, Ashikaga et al., 2015; Ribolli et al., 2017).

Observando os períodos reprodutivos ao longo dos anos, Henriques (2014) encontrou valores médios de H_o de 0,69 em amostras analisadas na bacia do Prata, assim como os dados encontrados por Rueda et al. (2011) 0,64 para *P. lineatus* na bacia no Paraná, valores estes próximos aos encontrados no presente estudo, onde os valores de H_o apresentaram variação de 0,31 a 0,68, Porém, Ferreira et al. (2017) e Rueda et al. (2013) encontram valores superiores, de 0,87 e 0,80 respectivamente, constatando uma diminuição da variabilidade genética da espécie na região.

Neste sentido, deve ser considerado que os níveis de variabilidade que caracterizam as populações estão ligados aos processos de adaptação das espécies, níveis estes que podem ser diminuídos com o aumento da endogamia (Frankhan et al., 2008) e modificações ambientais (Ashikaga et al., 2015). Os padrões de variação genética existente no genoma dos indivíduos que compõem as populações podem sofrer mudanças ao longo do tempo (Hilsdorf e Hallerman 2017), de tal modo que situações que causem isolamento, seja ele químico ou físico, podem se constituir em fatores determinantes de mudanças das características nas populações, do mesmo modo que situações de acúmulo de novas variações podem não ser compartilhadas através do fluxo gênico.

A espécie *P. lineatus* tem por sua natureza realizar grandes migrações e a manutenção de um alto fluxo gênico possibilitaria a existência de uma população panmítica. Contudo, conforme verificado, esta espécie apresentou evidências de estruturação entre os cardumes ao longo dos quatro anos de estudo. O aumento do Índice de Fixação Intrapopulacional (F_{ST}), parâmetro utilizado para avaliar a diferenciação total entre grupos, pode estar relacionado à redução da heterozigosidade em razão da deriva genética, ao aumento do endocruzamento pela redução populacional e à interrupção do fluxo gênico. O valor de F_{ST} é sempre positivo, variando de 0 a 1, onde 0 indica a ausência de diferenciação genética e caracterizando, portanto, uma população panmítica, enquanto o valor máximo 1 corresponde ao completo isolamento genético dos grupos, podendo estes até mesmo serem considerados espécies distintas. Dessa forma, Wright (1978) propôs uma escala dos índices de F_{ST} , sendo que valores abaixo de 0,05 seriam indicativos de pequena diferenciação genética; entre 0,05 e 0,15,

de diferenciação moderada; entre 0,15 e 0,25, de grande diferenciação; e valores acima de 0,25, de diferenciação muito elevada.

A análise da variância molecular (AMOVA) é um método para estimar a diferenciação populacional diretamente de dados moleculares e testar hipóteses sobre essa diferenciação (Excoffier et al., 1992). Neste estudo foram testadas a priori três hipóteses, sendo verificada a possibilidade dos cardumes se organizarem por proximidade familiar ao longo dos meses (grupos distintos por mês) e anos (grupos distintos ao longo dos anos) ou por período de migração (início, meio e final) para realizarem o processo reprodutivo.

Inicialmente testada, a hipótese de agrupamento por coleta teve como resultado um valor de F_{ST} de 0.05. Se por acaso a migração se desse por proximidade familiar este índice seria mais elevado, pois os indivíduos se agrupariam por proximidade genética dentro de cada cardume, gerando diferenças que seriam expressadas nas comparações entre os grupos. Em seguida foi testado o agrupamento por período de migração, de início, meio e final de cada período reprodutivo, a fim de verificar se os indivíduos migradores do início do processo seriam sempre do mesmo grupo familiar ao longo dos anos. O valor de F_{ST} de 0,03 encontrado nesta análise com valores significativos ($p < 0,0083$), indicou também pela recusa desta possibilidade. Em seguida foi testado o agrupamento em cardumes por período de migração (2007, 2008, 2009, 2010). Nesta análise foi encontrado um valor significativo ($p < 0,0083$) de F_{ST} de 0,13892, considerado um valor de estruturação moderada que ainda não havia sido relatado na literatura para *P. lineatus* da região, uma vez que Henriques (2013) encontrou um F_{ST} de 0,03 entre seus pontos coletados e Ferreira et al. (2017) obteve F_{ST} de 0.012. Em todos os estudos populacionais realizados com *P. lineatus* nos quais foram utilizados marcadores microssatélites, não foi identificada a existência de estruturação genética entre os grupos. Contudo, estes resultados foram obtidos a partir de comparações de grupos espacialmente distribuídos. Já no presente estudo, foi realizada uma análise comparativa dos grupos temporalmente distribuídos, sendo que possíveis mudanças no meio ambiente podem ter levado às modificações identificadas na estrutura dos cardumes. Por fim, a hipótese de estruturação por familiaridade de início, meio e final do período reprodutivo não apresentou nenhum valor significativo.

O valor de F_{ST} par a par entre os anos indicou diferenças genéticas entre os grupos, principalmente entre o período de Migração de 2008 e Migração 2010, valor este de 0,17, indicando que os cardumes poderiam estar sofrendo pressões abióticas

responsáveis pela seleção de determinados alelos, alterando a estrutura genética populacional. Rueda et al. (2013) estudou populações de *P. lineatus* em diferentes estações do ano (outono, inverno e primavera) em uma mesma localidade da Bacia do rio Uruguai e identificou que existem estoques diferentes ao longo do período de estudo. Segundo os autores está estruturação se daria provavelmente em decorrência de especificidades relacionadas ao ponto de coleta, sendo que o rio Uruguai seria uma área de trânsito entre a jusante de La Plata e os canais para o rio Paraná. Braga-Silva e Galetti (2015) relataram grupos geneticamente estruturados de *P. costatus* ao longo do tempo nos períodos reprodutivos, entretanto com valores de F_{ST} baixos, sugerindo a existência de ondas migratórias que atuariam na miscigenação das populações e, portanto, na diminuição das divergências.

Os dados resultantes das análises realizadas no presente trabalho apontam para a ocorrência de uma mudança no padrão genético das populações migradoras de *P. lineatus* ao longo dos anos, principalmente no ano de 2009, tornando os grupos migradores de 2010 (Migração10_Set; Migração10_Nov; Migração10_Dez) altamente diferenciados dos grupos migradores de 2008 (Out_08; Jan_08). Considera-se provável que alterações ambientais devam ter ocorrido no mês de novembro de 2009, que refletiram sobre os grupos migradores dos períodos subsequentes. É conhecido que a ocorrência de mudanças físico-químicas nos sistemas fluviais bem como as alterações ou reduções nos regimes sazonais de água impulsionados pelas mudanças climáticas aumentam os impactos nas populações de peixes de água doce (Allen, 2016). Provavelmente seja este o motivo da ocorrência da estruturação encontrada para os grupos de *P. lineatus* identificadas neste estudo, uma vez que foram também observados altos valores significativos de estruturação nos índices de F_{ST} par a par nas simulações entre os períodos reprodutivos ao longo dos anos por anos de migração (2007, 2008, 2009, 2010).

Outro fator a ser considerado é o impacto provocado pelo período de defeso (Lei Nº 10,779, de 25 de novembro de 2003), que proíbe a pesca durante a fase de reprodução dos peixes que legalmente abrange de primeiro de novembro à 28 de fevereiro de todos os anos. Durante os anos de 2009 e 2010, os dados de maturação gonadal obtidos revelaram que o ciclo reprodutivo da espécie ocorreu entre o início de setembro até o final de dezembro. Dessa forma, o defeso que cobriu a pesca durante os meses de novembro e dezembro nestes anos, deixou de proteger os cardumes precoces que por acaso chegaram à região de Cachoeira de Emas desde setembro e ficaram

sujeitos à predação pela pesca. Segundo Godoy (1975) as fêmeas são maiores, mais pesadas e facilmente predadas, tendo por característica buscar locais mais adequados para a desova e, segundo Raposo e Gurgel (2001), sua presença está totalmente relacionada à qualidade do ambiente. Neste caso, poderia ser considerado que a ação da pesca poderia ter ocasionado uma mudança nos estoques, uma vez que nesses anos foi evidenciado que a proporção de machos e fêmeas foi diferente em relação àquela descrita para os anos anteriores.

Marcador Mitocondrial D-loop

A análise de 217 amostras de *P. lineatus* com o uso do marcador mitocondrial (*D-loop*) resultou na identificação de 91 haplótipos diferentes, sendo que as análises de diversidade genética e diversidade nucleotídica realizadas revelaram altos valores de variabilidade genética em todos os grupos. O cardume que apresentou maior valor para ambas estimativas foi o cardume de Migracao07_Fev, com os valores de $1,00 \pm 0,04$ para diversidade genética e $0,12 \pm 0,07$ para diversidade nucleotídica.

Altos valores de variabilidade já foram evidenciados em trabalhos realizados por Ferreira et al. (2017), sendo que a diversidade haplotípica identificada no presente estudo apresentou uma maior variação (0,83 – 1,00). Do mesmo modo, o valor de diversidade nucleotídica encontrado também foi superior aos obtidos naquele mesmo estudo (0,01 – 0,019). Neste sentido, o número de haplótipos (89) identificado por Ferreira também foi semelhante ao aqui descrito e ambos foram superiores aos obtidos por Garcez et al. (2011) que apresentou 42 haplótipos em seu estudo. Desta forma, os estudos realizados têm demonstrado que a espécie *P. lineatus* possui uma alta variabilidade genética em suas populações.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi estimada nas mesmas situações em que foram analisados os dados obtidos com os marcadores microssatélites, porém os resultados foram diferentes em relação à existência de estruturação nas simulações geradas, mas semelhantes aos relatados na literatura para o mesmo marcador e espécie. Garcez et al. (2011) em estudo na bacia do Grande não encontraram estruturação genética entre os grupos, relatando um valor de F_{ST} de 0.025. Henriques (2014), avaliando estoques ao longo da bacia do Prata também encontrou índices semelhantes na AMOVA, com F_{ST} de 0,04, afirmando a existência de apenas um estoque, assim como Ferreira et al. (2017). Tal diferença nos resultados entre as análises resultantes do uso dos marcadores *D-loop* e microssatélites é resultante da característica de cada

marcador. O mtDNA apresenta menor taxa evolutiva relação aos microssatélites, sendo, portanto, considerado mais conservado.

A análise dos valores de F_{ST} par a par revelou a existência de diferenciação genética entre os cardumes de 2009 e de 2010 com valores superiores a 0,10, considerado por White (1945) como característica de uma estruturação moderada. Mais uma vez estes resultados corroboram a suspeita de ocorrência de alguma mudança ambiental que determinou modificações na estruturação genética destes grupos estudados. Este argumento também é reforçado pelos fatos constatados nos estudos com *P. lineatus* conduzidos por Rueda et al. (2013), com *P. costatus* realizados por Braga-Silva e Galetti Jr. (2016) e com *P. argenteus* por Coimbra et al. (2017), que também relataram a ocorrência de diferenças em estoques genéticos em diferentes momentos no mesmo local de amostragem ao longo do tempo.

Classificação etária, tamanho e maturação gonadal

A formação de marcas nas estruturas calcificadas de peixes pode se dar por diversos fatores ambientais, isto porque a diminuição completa ou parcial do crescimento durante algum momento de seu ciclo de vida pode ocasionar essas marcas. Um exemplo disto é a formação e maturação de gônadas durante o processo reprodutivo, que fazem com que indivíduos em maturação sexual concentrem suas energias para esta etapa.

Nas regiões Neotropicais, onde as variações de temperatura são menores, os anéis de crescimento também são consistentes com a periodicidade e assim, considera-se que outros fatores também podem ser responsáveis por dirigir sua formação (Barbieri et al., 2001). Estruturas como escamas têm sido utilizadas desde o início do século para estudos de idade dos peixes (Domingues e Hayashi, 1998). Diversos estudos como de dinâmica populacional, manejo da pesca e avaliação de estoques dependem do conhecimento sobre a estrutura etária das populações.

As análises dos anéis etários em escamas de *P. lineatus* realizadas a partir das amostras coletadas em diferentes momentos ao longo do período de 2007 a 2010 na Cachoeira de Emas revelaram que a maior frequência obtida foi para a classe etária III (com três anéis de crescimento), presente em todos cardumes coletados. Indivíduos mais novos (classe I) foram observados em meses esporádicos ao longo de todos os períodos amostrados. Já os indivíduos mais velhos (classe V) foram encontrados em dois

períodos de migração (2008 e 2009), não mais sendo observados no ano seguinte. A observação da Tabela 10, que mostra resultados das comparações de F_{ST} par a par entre os cardumes de *P. lineatus* amostrados utilizando *loci* microssatélites, revela que o cardume de novembro de 2009 não possui estruturação genética de grupo com cardumes anteriores e não possui nem indivíduos mais jovens e nem velhos, mas apenas de idades intermediárias, já em idade reprodutiva. Segundo Godoy (1975), as fêmeas de curimatã se reproduzem a partir do terceiro ano de vida e os machos a partir do segundo ano.

Diante da hipótese levantada por Machado e Foresti (2012) de que existe uma diferença entre cardumes residentes e migradores de *P. lineatus*, foi feito o teste estatístico a fim de averiguar se existe um padrão no tamanho dos cardumes migradores. Os resultados da análise mostraram diferenças significativas entre alguns cardumes, porém sem padrão definido. Pode ser suposto que estas diferenças sejam devidas à idade dos indivíduos, uma vez que na figura relacionada às classes etárias durante o período de 2008 e 2009 não foram identificados indivíduos novos, mas apenas indivíduos mais velhos. De acordo com Pauly e David (1981) peixes com um mesmo comprimento numa amostra apresentam a mesma idade, enquanto diferenças no tamanho podem ser atribuídas às diferenças de idade. A análise geral entre os cardumes, não revelou a existência de diferenças mostrando que, apesar de serem heterogêneos entre si, esta variabilidade não modifica o tamanho dos cardumes ao longo dos anos.

A proporção sexual em cardumes de peixes varia ao longo do tempo de vida da população em função de sucessivos eventos, que atuam de modo distinto sobre os indivíduos de cada sexo, uma vez que fêmeas necessitam de mais energia para realizar o processo de maturação gonadal, enquanto os machos são menores e menos predados pelo homem (Vazzoler, 1996; Gurgel, 2004). Esse comportamento diferenciado entre machos e fêmeas sugere que em certos momentos as proporções sejam modificadas (Vazzoler, 1996; Raposo e Gurgel, 2001), à exemplo do período reprodutivo, no qual foi observada maior quantidade de fêmeas do que machos. De acordo com Raposo e Gurgel (2001), a partir dos resultados em relação a proporção sexual de uma população pode-se deduzir se está ocorrendo crescimento ou não, pois uma maior frequência de machos significa uma reposta da população às condições desfavoráveis fornecidas pelo ambiente. Apesar da correlação positiva entre machos e fêmeas ao longo de toda a coletas, não foi possível estabelecer esta condição de forma conclusiva, devendo ser ressaltado, entretanto, que comparações por período de migração devem ser feitos.

Considera-se, ainda, que em consequência das mudanças climáticas e da pressão antrópica crescente neste ambiente, taxas menores de migração ou modificações nos padrões de migração podem ser esperadas (Wilcove e Wikalski 2008). As observações efetuadas durante os períodos reprodutivos revelam que há uma predominância de indivíduos das classes etárias dois e três, sendo provavelmente estes os indivíduos efetivos da espécie que realizam o processo reprodutivo. Os dados obtidos pelo presente estudo, além de revelarem uma alteração visível na idade dos peixes ao longo dos anos, também apontam para uma diminuição do período reprodutivo, que antes ocorria de setembro a fevereiro, passando depois a ocorrer de setembro a dezembro. Dado que o processo reprodutivo demanda a ocorrência de vários fatores ambientais combinados e sucessivamente sincronizados, o atraso ou modificação de fatores como intensidade de chuva, temperatura, turbidez e oxigenação da água certamente podem comprometer ou dificultar o sucesso reprodutivo de espécies de peixes migradores.

A alternância de períodos de cheia e seca constitui-se no fator fundamental na estruturação das comunidades e no funcionamento dos sistemas rios-planícies de inundação, com importantes reflexos sobre sua integridade biológica. O alagamento da calha principal sobre a planície adjacente promove acesso a novos habitats, oferecendo, no período de cheias, ambientes variados para desova, sobrevivência das larvas e desenvolvimento inicial de juvenis, elevando a disponibilidade de alimento e abrigo para todos os estágios do ciclo de vida das comunidades aquáticas (Junk et al., 1989). Além disso, o ciclo hidrológico sincroniza eventos biológicos como migração, maturação gonadal, desova e desenvolvimento larval, crescimento e alimentação. Neste estudo foram identificados, durante o processo de migração, indivíduos em todos os estágios de maturação gonadal, desde o estágio imaturo até o esgotado. Contudo, nos anos de 2009 e 2010, o número de indivíduos maduros foi menor que em maturação, principalmente no ano de 2010, sendo estes encontrados somente no último mês do período de coleta.

Segundo Ribeiro e Moreira (2012), fatores abióticos agem como desencadeadores da reprodução, ou seja, é possível afirmar que certas mudanças ambientais podem delimitar o período e o sucesso reprodutivo na maioria dos peixes. Quando os dados de pluviosidade na área abrangida pelo ecossistema em estudo foram cruzados com os períodos reprodutivos da espécie *P. lineatus*, verificou-se que o período de migração de 2010 não ocorreu de modo simultâneo ao período de chuvas,

sendo que o pico de precipitação não foi atingido no período de reprodução. Como os peixes são suscetíveis às mudanças no ambiente, fatores diversos passam a atuar nos indivíduos que enfrentam condições ambientais alteradas e a escassez de chuvas interfere na maturação final de suas gônadas, mesmo considerando-se que pode haver amadurecimento e desova em determinados locais. Nestas condições, se as lagoas marginais não são alagadas, estas não irão oferecer condições para o desenvolvimento e o crescimento das larvas.

Conclusões

Dada à complexidade e seu importante papel na manutenção e equilíbrio de uma comunidade, simplesmente documentar a presença e a duração do processo de migração e a conseqüente reprodução das espécies que empreendem movimentos biológicos no sentido de manutenção dos estoques, não é suficiente para indicar e compreender todos os fatores envolvidos neste processo. Neste estudo procurou-se entender, com o auxílio de diferentes ferramentas, como se dá este processo e quais são as implicações dos componentes biológicos e ambientais na estabilidade da estrutura populacional do curimatá *Prochilodus lineatus*, espécie de peixe que se apresenta como um componente importante do ecossistema da bacia hidrográfica do rio Paraná.

O processo de migração reprodutiva em peixes é um fenômeno generalizado e territorialmente abrangente para inúmeras espécies e a ocorrência da mudança em qualquer fator componente deste processo é um evento extremamente crítico, sendo logo percebido na dinâmica comportamental da espécie. Análises genéticas realizadas em exemplares de *P. lineatus* no rio Mojiguaçu durante o período de 2007 a 2010, usando marcadores do DNA mitocondrial e nuclear identificaram a existência de estrutura populacional ao longo do período de análise, principalmente entre os anos de 2009 e 2010. A princípio a espécie é conhecida por apresentar uma população extremamente grande, sendo encontrada em abundância ao longo da sua área de ocorrência. Embora o estoque desta espécie seja considerado por muitos autores como apresentando uma estrutura panmítica, essa hipótese parece não encontrar um reflexo de concordância completa a partir dos resultados obtidos no presente estudo. As análises mostraram uma predominância de indivíduos mais velhos na composição dos estoques migradores e uma frequência menor de indivíduos maduros durante o período que apresentou maior diferenciação genética (2009 e 2010).

Outro fato relevante nas análises foi a modificação notada com relação à proporção de machos e fêmeas no período amostrado, quando foi observada uma frequência maior de fêmeas durante o ciclo reprodutivo nos primeiros anos amostrados. Contudo, nos anos em que se obteve a maior variação da estrutura populacional (2009 e 2010) a quantidade de fêmeas foi menor. As fêmeas da espécie em estudo têm por característica serem geralmente maiores e mais pesadas que os machos, sendo, portanto, mais suscetíveis aos processos de captura. Deve ser lembrado que a pesca no ambiente de ocorrência está liberada até primeiro de novembro de cada ano, sendo proibida por lei a partir desta data até 28 de fevereiro do ano seguinte.

Os dados de captura e análise obtidos durante o período de migração foram analisados em conjunto com os índices pluviométricos da região, tendo sido identificado que nos anos de 2009 e 2010 o pico de chuva não foi atingido e não coincidiu com período de migração reprodutiva, que ocorreu de modo antecipado. A chuva é conhecida como um fator crucial para a reprodução dos peixes, pois aumenta os níveis de oxigênio, quantidade de água, turbidez e conseqüentemente promove o alagamento das lagoas marginais, que permitem o desenvolvimento e crescimento das larvas. É interessante notar que nas amostras capturadas neste período foram encontrados poucos indivíduos maduros.

Neste estudo foram analisados vários fatores relacionados ao padrão de migração da espécie e pode ser afirmado que a alteração no regime de chuvas se apresenta como o maior responsável pela sincronia do processo, permitindo que os peixes das classes dois e três de desenvolvimento gonadal tenham suas gônadas preparadas no período adequado, sendo que os estímulos secundários sucessivos dão prosseguimento para que a conclusão do ciclo seja atingida. A ocorrência de alteração deste fator principal que atua em sincronia e associação com os demais fatores faz com que os estoques migradores passem a apresentar indivíduos de diferentes idades tempos e estágios de maturação gonadal, o que pode determinar a ocorrência do processo reprodutivo em diferentes épocas e fora do período de defeso, permitindo assim ser objeto de pesca autorizada. Tal acúmulo de fatores pode se constituir em elemento efetivo de alteração do ciclo biológico destas espécies e, por conseguinte, serem modificadores da estrutura das populações de *P. lineatus* neste ambiente.

Referências

As referências citadas no texto encontram-se relacionadas no final da tese.

4 Considerações Gerais

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de compreender a diversidade e estrutura genética em escala temporal e os mecanismos envolvidos no processo migratório em espécies de peixes de água doce, em especial o curimatá (*Prochilodus lineatus Valenciennes, 1836*). Esta espécie de peixe migrador está amplamente distribuída na bacia do rio Paraná, principalmente nos rios Grande, Pardo e Mojiguaçu, região esta que tem sofrido importante e crescente ação de mudanças ambientais. As análises compreenderam a utilização de marcadores microssatélites e do marcador mitocondrial *D-loop* para estabelecer a estruturação genética destas populações frente às modificações ambientais.

Os resultados das investigações utilizando os marcadores microssatélite e mitocondriais nas populações de *Prochilodus lineatus* coletados em Cachoeira de Emas ao longo dos anos 2003, 2005, 2006, 2009, 2010 e 2015, identificaram a existência de alta variabilidade genética entre os componentes do estoque da espécie neste ambiente nos períodos analisados. Contudo, esta variabilidade não está uniformemente distribuída, sendo que nas comparações entre os grupos de 2005, 2009 e 2010 foram identificados valores de estruturação populacional moderada com relação aos demais períodos amostrados. Tais componentes de estruturação foram relacionados com os períodos em que o ecossistema foi acometido por um desastre ambiental ocorrido em setembro de 2003, quando as coletas se iniciaram, resultando em grande mortalidade de peixes; e num segundo momento, durante o período de 2009 e 2010, a região passou por evidente disfunção climática, com expressivas modificações no ciclo das chuvas. Como é conhecido, o regime de chuvas se apresenta como o principal responsável pela sincronia do processo biológico de desenvolvimento gonadal e de preparação do processo reprodutivo das espécies reofílicas, sendo suas gônadas preparadas no período adequado por um processo complexo de estímulos secundários sucessivos que dão prosseguimento para a conclusão do ciclo. Alterações destes fatores podem se constituir em elementos efetivo de alteração do ciclo biológico destas espécies e, por conseguinte, serem modificadores da estrutura das populações neste ambiente.

Nesta espécie, o ciclo reprodutivo se inicia nos machos por volta do primeiro ano de vida e nas fêmeas geralmente no terceiro ano. Assim poderia ser considerado que

a identificação de uma estruturação moderada para o marcador mitocondrial a partir de janeiro de 2005, tenha se dado em decorrência de um processo de recuperação ambiental, quando os indivíduos remanescentes do desastre começaram a contribuir geneticamente no ciclo reprodutivo da espécie. Este tipo de interpretação também pode ser aplicado em relação a estruturação observada nos microssatélites, que seria justificada pelo alto polimorfismo do marcador e pela existência de indivíduos nas lagoas marginais e em rios tributários que passaram a contribuir no sentido de uma restauração de variabilidade genética logo após o desastre.

Sendo assim, as alterações ambientais podem mudar as dinâmicas genéticas de populações ao longo do tempo, fato este observado até mesmo em grandes populações. Tais resultados são importantes também para avaliar possíveis danos causados em espécies com populações menores e ameaçadas de extinção. Com o passar dos anos *P. lineatus* manteve seus índices de variabilidade e a redução dos níveis de estruturação observado entre as primeiras e últimas coletas, mostrando que de certa forma a população tenha se recuperado.

O processo de migração em peixes é um fenômeno que ocorre para inúmeras espécies e modificação em qualquer momento deste processo são consideradas extremamente críticas. Análises genéticas realizadas em de *P. lineatus* identificaram também a existência de estrutura genética populacional nas análises dos grupos em processo migratório, sendo que a predominância de indivíduos mais velhos na composição dos estoques migradores e uma frequência menor de indivíduos maduros em dados momentos durante o período reprodutivo podem ter ocasionado o maior distanciamento genético entre estes cardumes.

Há indícios de que as modificações notadas com relação à proporção de machos e fêmeas no período amostrado, quando foi observada uma frequência maior de fêmeas durante o ciclo reprodutivo, podem resultar em efeitos modificadores da estruturação genética dos cardumes envolvidos, uma vez que as fêmeas da espécie em estudo têm por característica serem maiores e mais pesadas que os machos, tornam-se mais suscetíveis aos mecanismos de captura. Foi observado também que mudanças relacionadas ao período de chuvas que ocorreram no período de reprodução de 2009 e 2010, quando o maior índice pluviométrico não coincidiu perfeitamente com o período relacionado à migração estabelecido pelo defeso. A alteração no regime de chuvas se apresenta como o maior responsável pela sincronia do processo, permitindo que os peixes em desenvolvimento gonadal tenham suas gônadas preparadas no período

adequado e os estímulos secundários sucessivos dão prosseguimento para que a conclusão do ciclo seja atingida. Considerando que a migração de *P. lineatus* é determinada por um conjunto de estímulos ambientais que ocorre com o início das primeiras chuvas, peixes que habitam áreas de alimentação se sentem estimulados a subir em direção as cabeceiras, permitindo que a queima de gordura ocorra e suas gônadas sejam sincronizadas para a reprodução. Quando este ciclo se modifica, as alterações em suas populações são observadas rapidamente.

Em ambos os estudos realizados neste trabalho, foi constatado que as modificações ambientais que podem ocorrer devido a interferências antrópicas ou decorrentes de mudanças climática, causam alterações genéticas ao longo do tempo, mesmo em espécies como *P. lineatus* que se organizam em grandes populações. Estes resultados também deixam evidente que medidas visando minimizar impactos sob as espécies de peixes migradores devem ser revistas, uma vez que fixar o período de defeso a uma determinada época específica do ano não causa benefícios as espécies, uma vez que o período de chuva é irregular e suscetível também às mudanças climáticas. Outra medida que poderia evitar danos a esta espécie é o estabelecimento de tamanho mínimos e máximos de captura, uma vez que indivíduos machos são menores e as fêmeas maiores e evitariam sobrepesca em desproporcional entre machos e fêmeas. Assim, a identificação de alterações genéticas associadas aos efeitos de ações antrópicas tornam possível a adoção de medidas adequadas de manejo para a conservação dos elementos do ecossistema.

5 Referências

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. (2007) Ecologia e manejo de recurso pesqueiro em reservatórios do Brasil. Maringá: Eduem.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUK, H.I.; JÚLIO-JR, H.F. (2003) Migratory fishes of the upper Paraná river basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B; ROSS C; BAER A .2003). Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. Alaris Design, Victoria, Canada.
- ALLEN, M. (2016) Barriers to fish migration in drying climates: Contributions from south-western Australia (Doctoral dissertation, Murdoch University).
- ALTIZER, S., BARTEL, R., e HAN, B. A. (2011) Animal migration and infectious disease risk. Science, 331(6015., 296-302.
- ARIEDE, R. B., FREITAS, M. V., HATA, M. E., MATROCHIRICO-FILHO, V. A., UTSUNOMIA, R., MENDONÇA, F. F., e HASHIMOTO, D. T. (2017) Development of microsatellite markers using next-generation sequencing for the fish *Colossoma macropomum*. Molecular biology reports, 1-10.

- ASHIKAGA, FY, ORSI, ML, OLIVEIRA, C., SENHORINI, JA, e FORESTI, F. (2015) Espécies ameaçadas de extinção, Brycon orbignyanus: análise genética e definição de áreas prioritárias para conservação. *Biologia Ambiental dos Peixes*, 98 (7., 1845-1855.
- BANDELT, H.J., FORSTER, P., RÖHL, A.1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution.*; 16: 37-48.
- BARBIERI, G., SALLES, F. A., e CESTAROLLI, M. A. (2000) Análise populacional do curimatá, *Prochilodus lineatus*, do rio Mojiguaçu, Pirassununga, SP (Characiformes, Prochilodontidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, 26.2., 137-145.
- BARROCA, T.M.; ARANTES, F.P.; MAGALHÃES, B.F.; SIQUEIRA, F.F.; HORTA, C.C.R; PENA, I.F.; DERGAM, J.Á.; KALAPOTHAKIS, E. (2012) 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*. 2: 121-130.
- BAUER, S., e HOYE, B. J. (2014) Migratory animals couple biodiversity and ecosystem functioning worldwide. *Science*, 344(6179., 1242552.
- BEHEREGARAY, L. B., MÖLLER, L. M., SCHWARTZ, T. S., CHAO, N. L., e CACCONE, A. (2004) Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazonia. *Molecular Ecology Resources*, 4(3., 330-332.
- BILLINGTON, N. e HEBERT, P. (1991) Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1: 80-94.
- BOLGER, D. T., NEWMARK, W. D., MORRISON, T. A., e DOAK, D. F. (2008) The need for integrative approaches to understand and conserve migratory ungulates. *Ecology letters*, 11.1., 63-77.
- BONETTO, A.A. (1986) Fish of the Paraná system. In: Davies, B.R.; Walker, K.F. (Eds.) *The Ecology of River Systems*, Dr W. Junk, Dordrecht, The Netherlands. pp. 573–588.
- BÖRGER, L. (2016) Stuck in motion? Reconnecting questions and tools in movement ecology. *Journal of Animal Ecology*, 85.1., 5-10.
- BRAGA-SILVA, A., e GALETTI, P. M. (2016) Evidence of isolation by time in freshwater migratory fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Hydrobiologia*, 765.1., 159-167.
- BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, A, E. L. G. (2003) *Limnologia Fluvial – um estudo no rio Mojiguaçu*. Rima Editora – São Carlos – SP, 260 p.
- CABRERA, S.E., CANDIA, C. (1964) Contribución al conocimiento de la biología del sabalo (*Prochilodus platensis* Holmberg) del río de la Plata; B, Estudio bio-ecológico, III: Analisis del crecimiento; C, Estudio bio-económico. *Revista de Investigaciones Agropecuarias, Series 1*, 4:57-83.
- CHARLESWORTH, DEBORAH; WILLIS, JOHN H. The genetics of inbreeding depression. *Nature reviews genetics*, v. 10, n. 11, p. 783, (2009)
- CHRISTIAKOV, D.A.; HELLEMANS, B. e VOLCKAERT, F.A.M. (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255:1–29.
- COIMBRA, M.R., LIMA, A.P., OLIVEIRA, K.K., e SEVERI, W. (2017) Microsatellite assessment of the genetic diversity in indigenous populations of curimba (*Prochilodus argenteus*) in the São Francisco river (Brazil). *Conservation Genetics*, 1-11.

- COMTE, L., e OLDEN, J. D. (2017) Climatic vulnerability of the world's freshwater and marine fishes. *Nature Climate Change*, 7.10., 718.
- COOKE, S.J., HINCH, S.G., FARRELL, A.P. et al. (2008) Developing a mechanistic understanding of fish migrations by linking telemetry with physiology, behavior, genomics and experimental biology: an interdisciplinary case study on adult Fraser River sockeye salmon. *Fisheries*, 33, 321-338.
- CROOK, D. A., LOWE, W. H., ALLENDORF, F. W., ERŐS, T., FINN, D. S., GILLANDERS, B. M., .. e KILADA, R. W. (2015) Human effects on ecological connectivity in aquatic ecosystems: integrating scientific approaches to support management and mitigation. *Science of the Total Environment*, 534, 52-64.
- DE BEM, J. (2017) Recursos pesqueiros e a diversidade da ictiofauna no alto rio Uruguai: efeito dos peixes predadores topo de cadeia. (Tese) Programa de Pós graduação em Aquicultura e Recursos Pesqueiros. Universidade Federal de Santa Catarina.
- DINGLE, H. e DRAKE, A. V. (2007) What is migration? *BioScience* 57, 113–121.
- DINGLE, H. (2006) Animal migration: is there a common migratory syndrome? *Journal of Ornithology*, 147, 212–220.
- DINGLE, H. (2014) *Migration: the biology of life on the move*. Oxford University Press, USA.
- DOMINGUES, W. M., e HAYASHI, C. (1998) Estudo experimental sobre anéis diários em escamas nas fases iniciais do desenvolvimento do curimba, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836. (Characiformes, Prochilodontidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 58, 609-617.
- DUDGEON, D. (2014) Threats to freshwater biodiversity in a changing world. In *Global environmental change* (pp. 243-253. Springer Netherlands.
- EXCOFFIER, L., e LISCHER, H. E. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux/Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3., 564-567.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., e SCHNEIDER, S. (2005) Arlequin (version 3.0.: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E., e QUATTRO, J. M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131.2., 479-491.
- FAABORG, J., HOLMES, R. T., ANDERS, A. D., BILDSTEIN, K. L., DUGGER, K. M., GAUTHREAUX, S. A., .. e LATTA, S. C. (2010) Recent advances in understanding migration systems of New World land birds. *Ecological monographs*, 80.1., 3-48.
- FAULKS, L. K., KEREZSY, A., UNMACK, P. J., JOHNSON, J. B., e HUGHES, J. M. (2017) Going, going, gone? Loss of genetic diversity in two critically endangered Australian freshwater fishes, *Scaturiginichthys vermeilipinnis* and *Chlamydogobius squamigenus*, from Great Artesian Basin springs at Edgbaston, Queensland, Australia. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 27.1., 39-50.
- FERREIRA, D.G., SOUZA-SHIBATTA, L., SHIBATTA, O.A., SOFIA, S.H., CARLSSON, J., DIAS, J.H.P., .. E MAKRAKIS, M.C. (2017) Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system. *Reviews in Fish Biology Fisheries*, 27.1., 209-231.
- FLECKER, .AS .1996. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology*, 77: 1845–1854.

- FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., e BRISCOE, D. A. (2008) Fundamentos de genética da conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética
- FRANKHAM, R., BRADSHAW, C. J., & BROOK, B. W. (2014) Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, 170, 56-63.
- GARCEZ, R., CALCAGNOTTO, D., ALMEIDA-TOLEDO, D., e FORESTI, L. (2011) 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*, 21(3.), 268-275.
- GILLANDERS, B. M., IZZO, C., DOUBLEDAY, Z. A., e YE, Q. (2015) Partial migration: growth varies between resident and migratory fish. *Biology letters*, 11(3.), 20140850.
- GODOY, M. P. 1975. Peixes do Brasil. Subordem Characoidei. Bacia do rio Mogi-Guassu. Ed. Franciscana, Piracicaba, São Paulo. p. 219-397.
- GOUDET, J. (1995) FSTAT (Version 1.2.: A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86(6.):485-486.
- GOUDIE, A. S. (2018) Impacto humano no ambiente natural . John Wiley & Sons.
- GRILL, G., LEHNER, B., LUMSDON, A. E., MACDONALD, G. K., ZARFL, C., e LIERMANN, C. R. (2015) An index-based framework for assessing patterns and trends in river fragmentation na flow regulation by global dams at multiple scales. *Environmental Research Letters*, 10.1., 015001.
- GUO, S.; THOMSON, E. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 144: 1933-1940.
- GURGEL, H. D. C. B. (2004) Populational structure and breeding season of *Astyanax fasciatus* Cuvier (Characidae, Tetragonopterinae) from Ceará Mirim River, Poço Branco, rio Grande do Norte, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21.1., 131-135.
- HARSCH, M. A., PHILLIPS, A., ZHOU, Y., LEUNG, M. R., RINNAN, D. S., e KOT, M. (2017) Moving forward: insight sea plications of moving-habitat models for climate change ecology. *Journal of Ecology*.
- HARTL, D. L., CLARK, A. G., e CLARK, A. G. 1997. Principles of population genetics (Vol. 116. Sunderland: Sinauer associates.
- HEIST, E.J., GOLD, J.R. (1999) Microsatellite variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and Mid-Atlantic Bight. *Copeia*: 182-186.
- HENRIQUES, J. M. (2014) Análise da diversidade genética em Curimatá (*Prochilodus*) da Bacia do Prata e Amazônia. (Tese) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Zoologia.
- HILSDORF, AW, E HALLERMAN, EM . (2017) Genetic Resources of Freshwater Neotropical Fishes. In: Genetic Resources of Neotropical Fishes (pp. 119-210. Springer International Publishing.
- HOFFMANN, A. A., SGRÒ, C. M., e KRISTENSEN, T. N. (2017) Revisiting adaptive potential, population size, and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 32(7.), 506-517.
- HUTCHINSON, W. F., VAN OOSTERHOUT, C., ROGERS, S. I., e CARVALHO, G. R. (2003) Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in declining North Sea cod (*Gadus morhua*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270.1529., 2125-2132.

- IWASAKI, Y., RYO, M., SUI, P., e YOSHIMURA, C. (2012) Evaluating the relationship between basin-scale fish species richness and ecologically relevant flow characteristics in rivers worldwide. *Freshwater Biology*, 57.10., 2173-2180.
- IZZO, C., DOUBLEDAY, Z. A., GRAMMER, G. L., GILMORE, K. L., ALLEWAY, H. K., BARNES, T. C., .. e GILLANDERS, B. M. (2016) Fish as proxies of ecological and environmental change. *Reviews in Fish Biology/Fisheries*, 26(3., 265-286.
- JUNK, W. (1989) Flood tolerance and tree distribution in central Amazonian floodplains. Holm-nielsen. *Tropical forests; botanical dynamics, speciation, and diversity*., 47-64.
- KNOUFT, J. H., e FICKLIN, D. L. (2017) The Potential Impacts of Climate Change on Biodiversity in Flowing Freshwater Systems. *Annual Review of Ecology, Evolution, na Systematics*, 48.1.
- KOCHER T.D.; STEPHIEN CA .1997. *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, London, U.K
- LEWIN B . (1994) *Genes V*. Oxford University Press Inc., New York, 1272 p.
- MACHADO, M. R. F.; FORESTI, F. (2012) Morphometric characteristics of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1847., of the migratory and resident stocks of the river Mogí-Guaçu, São Paulo State, Brazil. *Acta Scientiarum. Zootechny*, v. 34, p. 341-346.
- MACHADO, V. N., WILLIS, S. C., TEIXEIRA, A. S., HRBEK, T., e FARIAS, I. P. (2017) Population genetic structure of the Amazonian black flannelmouth characin (Characiformes, Prochilodontidae: *Prochilodus nigricans* Spix e Agassiz, 1829.: contemporary and historical gene flow of a migratory and abundant fishery species. *Environmental Biology of Fishes*, 100.1., 1-16.
- MASTROCHIRICO-FILHO, V. A., FREITAS, M. V., ARIEDE, R. B., LIRA, L. V., MENDES, N. J., e HASHIMOTO, D. T. (2018) Genetic Applications in the Conservation of Neotropical Freshwater Fish. In: *Biological Resources of Water*. IntechOpen.
- MATSUMOTO, C.K.; HILSDORF, A.W.S . (2009) 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*, 7: 395-402.
- MELO, B. F., SATO, Y., FORESTI, F., e OLIVEIRA, C. (2013) The roles of marginal lagoons in the maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *P. costatus*. *Neotropical Ichthyology*, 11 (3., 625-636.
- MENDES, N. J., CRUZ, V. P., ASHIKAGA, F. Y., CAMARGO, S. M., OLIVEIRA, C., PIERCY, A. N.,e FORESTI, F. (2016) Microsatellite loci in the tiger shark and cross-species amplification using pyrosequencing technology. *PeerJ*, 4, e2205.
- MEYERS, L. A., e BULL, J. J. (2002) Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. *Trends in Ecology and Evolution*, 17.12., 551-557.
- MILLS, L. S., SOULÉ, M. E., E DOAK, D. F. (1993) The keystone-species concept in ecology and conservation. *BioScience*, 43(4., 219-224.
- MORAIS-FILHO, M. B.; SCHUBART, O. (1955) Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae). Ministério da Agricultura. Divisão de Caça e Pesca, São Paulo, Brasil, 131 pp.
- MORELLI, K. A., REVALDAVES, E., OLIVEIRA, C., e FORESTI, F. (2007) Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus*

- macrocephalus (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Resources*, 7.1., 32-34.
- NEI, M.; LI, W. H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76:5269–5273.
- NIEMINEN, E., HYYTIÄINEN, K., E LINDROOS, M. (2017) Economic and policy considerations regarding hydropower and migratory fish. *Fish and Fisheries*, 18.1., 54-78. v. 170, p. 56-63, 2014.
- OLIVEIRA, K. K., LIMA, A. P., e COIMBRA, M. R. (2015) Isolation and characterization of the first microsatellite markers in the Neotropical freshwater fish piau-verdadeiro, *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837. *Conservation genetics resources*, 7.1., 77-79.
- PAIVA, M. P. (1982) *Grandes Represas do Brasil*. Brasília, DF, Editerra, 304p
- PAULY, D., DAVID, N., e PAULY, D. (1981). *ELEFAN I. Length-Based Methods in Fisheries Research*, 1.
- PEREIRA, L.H.G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. (2009) Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggest homing behavior. *Ecology of Freshwater Fish*, 18: 215-225.
- PERINI, V. R. (2013) *Biologia reprodutiva e estrutura populacional de Prochilodus lineatus em um remanescente lótico da Bacia do rio Grande*. (Tese) Programa de Pós-graduação em Ciências (área de concentração em Biologia Celular), UFMG.
- PIGNALBERI, C., CORDIVIOLA de YUAN, E.C . (1973) Biometria del "sabalo" (*Prochilodus platensis* Holmberg) de diversos ambientes del Parana medio (Pisces, Tetragonopteridae). *Physis*, series B, 32(84.:29-40 .
- PULIDO, F., e BERTHOLD, P. (2003) Quantitative genetic analysis of migratory behaviour. In: *Avian migration* (pp. 53-77. Springer, Berlin, Heidelberg.
- PURDOM, C.E. (1993) *Genetics and Fish breeding*. Chapman and Hall editors. London.
- RAND, DM, e KANN, LM . (1998) Mutação e seleção em locais silenciosos e de substituição na evolução do DNA mitocondrial animal. *Genetica* , 102 , 393-407.
- RAPOSO, R. D. M. G., e GURGEL, H. D. C. B. (2008) Estrutura populacional de *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1860 (Pisces, Serrasalminidae) da lagoa de Extremoz, Estado do rio Grande do Norte, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 23, 409-414.
- RIBEIRO, C., e MOREIRA, R. G. (2012) Fatores ambientais e reprodução dos peixes. *Revista da Biologia*.
- RIBOLLI, J., HOEINGHAUS, D. J., JOHNSON, J. A., ZANIBONI-FILHO, E., DE FREITAS, P. D., e GALETTI, P. M. (2017) Isolation-by-time population structure in potamodromous dourado *Salminus brasiliensis* in southern Brazil. *Conservation Genetics*, 18.1., 67-76.
- RIEDE, K. (2002) *Global register of migratory species*. German Federal Agency for Nature Conservation, Project 808 05 081.
- ROUSSET, F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*; 8:103-106.
- ROZAS, J., S ANCHEZ-DELBARRIO, J. C., MESSEGUER, X., e ROZAS, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent other methods. *Bioinformatics*, 19.18., 2496-2497.
- RUEDA, E. C., CARRIQUIRIBORDE, P., MONZ N, A. M., SOMOZA, G. M., e ORT , G. (2013) Seasonal variation in genetic population structure of s balo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. *Genetica*, 141(7-9., 401-407.

- RUEDA, E.C.; SOMMER, J.; SCARABOTTI, P.; MARKARIANI, R.; ORTÍ, G. (2011) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). *Conservation Genetics. Resour.* 3:681-84.
- SANCHES, A; GALETTI JR, P.M.; GALZERANI, F., DERAZO, J.; CUTILAK-BIANCHI, B.; HATANAKA, T. (2012) Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaeniae*, *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Lat Am J Aqua Res.* 40: 177-186.
- SCHLÖTTERER, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosome*, 109(6), 365-371.
- SCHUELKE, M. (2000) An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- SHAW, T. J., e MARTIN, P. (2016) Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration. *Current opinion in cell biology*,
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407-417.
- SLATKIN M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics.*; 139:457–462.
- SVERLIJ, S., ROS, A; ORTI, G. (1993) Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del Sabalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847. *FAO Sinopsis sobre la Pesca*, 154: 1-64.
- TAJIMA F. (1989) Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics.* 123: 585-595.
- TAJIMA F. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics.* 1996; 143: 1457-1465.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M e KUMAR S. MEGA5. (2011) Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution.*; 28: 2731-2739.
- TAYLOR, H. R., KARDOS, M. D., RAMSTAD, K. M., e ALLENDORF, F. W. (2015) Valid estimates of individual inbreeding coefficients from marker-based pedigrees are not feasible in wild populations with low allelic diversity. *Conservation genetics*, 16(4.), 901-913.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 24: 4876-4882.
- TOLEDO-FILHO, S. A. (1981) *Biologia populacional do curimatá (Prochilodus scrofa Steindachner, 1881. (Pisces, Prochilodontidae) do rio Mojiguaçu: Aspectos quantitativos. Tese de Doutorado, USP, São Paulo*
- TORLONI, C.E.C.; CORRÊA, A.R.A.; CARVALHO JR., A.A.D.; SANTOS, J.J.D.; GONÇALVES, J.L.; GERETO, E.J.; CRUZ, J.A.; MOREIRA, J.A.; SILVA, D.C.; DEUS, E.F.; FERREIRA, A.S. (1993). *Produção pesqueira e composição das capturas em reservatórios sob concessão da CESP nos rios Tietê, Paraná e Grande, no período de 1986 a 1991. São Paulo, CESP, Série Produção Pesqueira, 001: 73p.*

- VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W.F., WILLS, D.P.M E SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: (2004) Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*. 4:535-538.
- VAZZOLER, A. E. A. M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Eduem, 169.
- VIDAL, J.C. (1967) Contribución., estudio biológico del sabalo de los ríos Parana y Uruguay. Secretaria Estadual de Agricultura. 1-51.
- VIEIRA, L.J.S. e VERANI, J.R. (2000) Diversidade e capturabilidade em comunidades de peixes de lagoas marginais do rio Mojiguaçu submetidas a diferentes graus de assoreamento. In *Estudos integrados em ecossistema: Estação Ecológica de Jataí* (J.E. dos Santos e J.S.R. Pires, eds.). RIMA, São Carlos, p. 831-850.
- VILLANOVA, G. V., VERA, M., DÍAZ, J., MARTINEZ, P., CALCATERRA, N. B., e ARRANZ, S. E. (2015) Isolation and characterization of 20 polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Leporinus obtusidens* (Characiformes: Anostomidae) using 454 shotgun pyrosequencing. *Journal of fish biology*, 86(3.), 1209-1217.
- WEIR, B.S. e COCKERHAM, C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.*; 38:1358-1370.
- WELCOMME, R. L. (1985). *River fisheries [Pesca fluvial]*. FAO fisheries technical paper, 262, 330.
- WILCOVE, D. S., e WIKELSKI, M. (2008) Going, going, gone: is animal migration disappearing. *PLoS biology*, 6 (7), e188.