

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

YASMIN GARCIA

**Identificação de SNPs e genética populacional de cardumes
migradores e residentes de *Prochilodus lineatus* (Characiformes:
Prochilodontidae).**

Botucatu, SP

- 2022 -

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

YASMIN GARCIA

Identificação de SNPs e genética populacional de cardumes migradores e residentes de *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae).

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Bociências, Botucatu, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: Prof. Assoc. Fábio Porto-Foresti

Botucatu, SP

- 2022 -

G216 Garcia, Yasmin
Identificação de SNPs e genética populacional de cardumes migradores e residentes de *Prochilodus lineatus*(Characiformes: Prochilodontidae). / Yasmin Garcia. -- Botucatu, 2022
63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista(Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Fábio Porto-Foresti

1. Genética animal. 2. SNPs. 3. Rio Mogi-Guaçu. 4. *Prochilodus lineatus*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

“ O Aprendizado é o significado mais límpido da vida, pois já mais se termina uma existência sem que se aprenda algo. ”

- Maria Clara Fraga Lopes

A todos aqueles que, de perto ou de longe, estiveram presentes
em uma das etapas mais marcantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço meus pais, João e Luciane, e meu irmão Étore, que me forneceram suporte emocional e seguraram minha mão nos momentos difíceis. Ao restante da minha família, que sempre se fez presente e torceu tanto por mim.

Agradeço as minhas amigas de Jaú, Maria Isabel, Jéssica e Kayra, por fazerem parte de tudo. Em especial, a Fernanda, minha melhor amiga, que apoiou minhas escolhas, me aconselhou e esteve presente em cada momento desde que nos conhecemos, honrando esse título. Obrigada ferzoca.

Ao LAGENPE, que mais do que um laboratório, foi onde construí uma família. Aos antigos lagenpeiros, Raul e Cahique, que também fizeram parte dessa etapa. As lagenpinhas da molecular Camila, Verônica, Funari, Giovana e Ana Laura, que eu tive a oportunidade de conhecer e contribuir nos últimos meses e construí um laço valioso. A Bia, Mel, Vitor, Allan e Amanda, que em pouco tempo já construí uma amizade que quero levar comigo. A Nat, que também se fez presente nessa etapa, nos longos dias, nas festas, nas risadas.

Ao Vito, que me ensinou e acompanhou durante a dura jornada que é a bioinformática hahaha.

A Fer, que acompanhou minha formação desde o início sendo minha banca de TCC, que contribuiu muito e ensinou parte do que sei hoje. Obrigada por ter feito parte desse processo e por, além disso, ser uma querida amiga.

Ao Caio Goes, que esteve do meu lado (literalmente) e vibrou com cada conquista minha, me ajudou em todos os momentos e sempre acreditou em mim.

Ao Caio Felipe e a Gabi, meus parceiros das festas, de aprendizado, das fofocas e de tantos momentos que vivemos e ainda vamos viver.

A Papiro, amizade que mais me surpreendeu e foi fortalecida em cada dificuldade e rendeu muitas histórias. Foram longos dias extraíndo DNA e montando biblioteca de SNPs. Obrigada por ter permanecido comigo amika, no laboratório e na vida.

Ao Henriqueta, que me encheu o saco todos os minutos desde que entrou no laboratório, e dessa forma se fez tão importante nos meus dias.

Ao Zenin, meu melhor amigo, que me adotou em 2016 e desde 2018 conviveu comigo todos os dias. Obrigada por todas as caronas, por ficar acordado me distraíndo nas crises de ansiedade e me dar um abraço quando tudo parecia impossível. Obrigada por cada detalhe em que você se fez presente todo dia. Você não vai se livrar de mim, que fique claro rs.

Ao Tarja, que esteve presente durante toda a minha formação na pós, aconselhando e me auxiliando. Muito obrigada.

Encerrar esse ciclo não implica em deixar para trás quem fez parte dele. Quero levá-los para vida. Obrigada por tudo, eu amo vocês.

A Débora e a Camila, que mesmo não morando mais comigo, acompanharam os principais momentos e me deram suporte.

A Babi, que em 2021 entrou na minha vida e desde então, só acrescentou. Obrigada por ser tão presente, cuidar de mim nos dias que estou triste, ouvir longos desabaços e compartilhar a vida e o dia a dia (e o apartamento rs) comigo. Sua amizade, pra mim, é como se viesse de longas datas e quero levar pra vida.

Ao Diego e ao IBTEC, que cederam tempo, material, espaço e conhecimento para o desenvolvimento do projeto.

Ao professor George e outros membros do CEPTA, que auxiliaram nas coletas e planejamento do projeto.

Ao professor e orientador Fábio Porto-Foresti, que além de me orientar, me aconselhou e me apoiou desde a iniciação científica, comemorando as minhas conquistas, acreditando em mim e me dando suporte quando precisei. Obrigada por acreditar em mim.

A CAPES, por ter financiado meu projeto de mestrado e permitido que essa pesquisa acontecesse.

Resumo

O conhecimento acerca da dinâmica e biologia de espécies de peixes migradores é essencial para a manutenção da diversidade genética. Uma das espécies mais frequentes no ambiente neotropical é *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecida como curimatá. Considerado um peixe migrador de longas distâncias, *P. lineatus* compõe extensos cardumes que migram nos rios da bacia do Alto Paraná durante a piracema. Cardumes de curimatás residentes vem sendo observados, sendo os peixes que deixam de migrar e se estabelecem em uma região, dando indícios de uma possível existência de estoques geneticamente distintos. Considerando a importância das espécies migradoras para o ecossistema, o objetivo desse trabalho foi desenvolver marcadores moleculares do tipo SNPs (Polimorfismo de nucleotídeo único) para *P. lineatus* e aplicá-los através de metodologias de genética populacional em cardumes migradores e residentes para identificar a possível existência de estruturação e analisar a variabilidade genética nestes grupos biológicos. Para tal, utilizou-se a tecnologia RAD de dupla digestão (ddRAD-seq) em 80 amostras de curimatás coletados no Rio Mogi-Guaçu, na região da Cachoeira de Emas, SP, sendo analisados 10 indivíduos migradores e 10 residentes capturados a cada ano (2008, 2009, 2010 e 2021). Ao final da extração de DNA, elaboração das bibliotecas e sequenciamento, as filtragens resultaram em 4.085 SNPs que foram utilizados em análises populacionais. Para todos os anos, os valores de heterozigosidade observada (H_o) e da heterozigosidade esperada (H_e) foram semelhantes e os valores de H_{WE} indicaram um excesso de homozigotos. Os valores de F_{IS} , positivos e significativos, indicaram um tênue nível de endogamia nos grupos analisados. Os valores de F_{ST} indicaram a existência de agrupamentos entre os residentes de 2008 e 2021, enquanto os migradores demonstraram uma maior homogeneização de clusters. O AMOVA indicou a maior diferenciação entre indivíduos dentro das populações, mas uma significativa diferenciação entre grupos. Sendo assim, é possível concluir que os grupos de migradores permanecem com fluxo gênico, enquanto o de residentes podem estar apresentando um início de processo de estruturação, que poderá ser evidenciado ao longo dos próximos anos com a queda do número efetivo populacional, fazendo com que seja necessário o monitoramento dos curimatás do rio Mogi-Guaçu para que não haja perda da variabilidade genética nos cardumes.

Abstract

Knowledge about the dynamics and biology of migratory fish species is essential for the maintenance of genetic diversity. One of the most frequent species in the neotropical environment is *Prochilodus lineatus*, popularly known as curimatá. Considered a long-distance migratory fish, *P. lineatus* makes up extensive shoals that migrate in the rivers of the Upper Paraná basin during spawning. Shoals of resident curimatás have been observed, with fish that stop migrating and settle in a region, indicating the possible existence of genetically distinct stocks. Considering the importance of migratory species to the ecosystem, the objective of this work was to develop SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) molecular markers for *P. lineatus* and apply them through population genetics methodologies in migratory and resident schools to identify the possible existence of structuring and to analyze the genetic variability in these biological groups. For this, the double digestion RAD technology (ddRAD-seq) was used in 80 samples of curimatás collected in the Mogi-Guaçu River, in the region of Cachoeira de Emas, SP, being analyzed 10 migratory individuals and 10 residents captured each year (2008, 2009, 2010 and 2021). At the end of DNA extraction, elaboration of libraries and sequencing, the filters resulted in 4085 SNPs that were used in population analyses. For all years, observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_E) values were similar, and H_{WE} values indicated an excess of homozygotes. The F_{IS} values were positive and significant, indicating a low level of inbreeding in the analyzed groups. The F_{ST} values indicated the existence of clusters between the residents of 2008 and 2021, while the migrants showed a greater homogenization of clusters. AMOVA indicated the greatest differentiation between individuals within populations, but a significant differentiation between groups. Therefore, it is possible to conclude that the migratory groups remain with gene flow, while the resident groups may be showing the beginning of a structuring process, which may be evidenced over the next few years with the drop in the effective population number, causing it is necessary to monitor the curimatás of the Mogi-Guaçu river so that there is no loss of genetic variability in the shoals.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Ictiofauna neotropical e rio Mogi-Guaçu	10
1.2 Peixes migradores continentais	12
1.3 Descrição da espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	14
1.4 Peixes migradores e residentes	18
1.5 Análises de diversidade genética de peixes Neotropicais	20
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Área de estudo	25
3.2 Extração de DNA.....	26
3.3 Construção das bibliotecas	27
3.4 Análises bioinformáticas.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
Capítulo.....	33
Resumo.....	33
Introdução	34
Material e métodos.....	36
Resultados	39
Discussão e conclusão	45
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
MATERIAIS COMPLEMENTARES	59

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1.....	12
Figura 2.....	16
Figura 3.....	25
Figura 4 A, B e C.....	29
Figura 5.....	40
Figura 6.....	44
Figura 7.....	45

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1	37
Tabela 2	41
Tabela 3	43
Tabela 4	43

SUMÁRIO DE GRÁFICOS

Gráfico 1	42
Gráfico 2.....	42

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Ictiofauna Neotropical e rio Mogi-Guaçu

Com mais de 33.900 espécies descritas, os peixes estão entre o grupo de vertebrados mais diverso do planeta. A maior parte dessa riqueza é encontrada em ambientes dulcícolas (NELSON, 2016) e mais de 6 mil espécies estão presentes na região Neotropical (WENDT, 2019). Dentro desta vasta região, o Brasil se destaca pela grande variedade de ambientes e climas, além da grande heterogeneidade de bacias hidrográficas, resultando na maior diversidade de peixes de água doce do mundo. Todavia, as modificações ambientais geradas pelo aumento da exploração de recursos naturais para atender ao crescente nível de consumo causado pelo crescimento populacional têm tomado grandes proporções, levando populações naturais de peixes ao declínio e até mesmo à extinção (NOBILE et al., 2019).

Os peixes servem como base alimentar e econômica para comunidades locais e costeiras (HOEINGHAUS et al., 2009), além de serem essenciais para a manutenção ecossistêmica, já que auxiliam na regulação e ciclagem de nutrientes (HELFMAN & COLLETTE, 2009). Ao considerar os recursos hídricos como propulsores do avanço social e econômico, sabe-se que uma parcela dos impactos na ictiofauna continental está relacionada ao aumento populacional nas cidades, o que gera maior demanda de água para consumo, produção de alimentos e geração de energia (WORLD BANK, 2016; COSTA, 2021).

Barramentos, sobrepesca e desmatamento são os principais propulsores de impacto em ambiente aquático. As espécies reofílicas, que dependem dos pulsos de

inundação para migração e reprodução são as que mais sofrem ameaças com as alterações causadas pela regulação da vazão dos rios barrados (COSTA, 2021), assim como espécies abundantes são as que sofrem maior incidência da sobrepesca. Conservar as bacias mais representativas a nível de biodiversidade e endemismo através de estudos sobre a biologia das espécies que as habitam é uma das medidas mitigadoras mais efetivas para diminuir tais impactos.

A bacia do Alto Paraná é considerada o segundo maior sistema de drenagem da América com Sul, com 3,2 milhões de km² (LOWE-MCCONNELL, 1999) e com mais de 360 espécies de peixes já descritas (CARVALHO & LANGEANI, 2013). A heterogeneidade de habitats e a abrangência na distribuição dessa bacia hidrográfica são características que contribuem para a manutenção dessa biodiversidade (BUCKUP et al., 2003; LANGEANI et al., 2007). Ela é composta por diversos afluentes e um de seus maiores ecossistemas é formado pelo complexo rio Grande-Pardo-Mogi (figura 1).

A bacia do Rio Mogi-Guaçu abrange 38 municípios e está localizada na região sudoeste do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. Diversos autores, como Silva et al. (2017) e Lopes et al. (2019) descreveram em seus trabalhos o papel de afluentes como os rios Mogi-Guaçu e Pardo na conservação de espécies de peixes, como locais favoráveis para desova, como ambientes berçários e de alimentação e ainda como rotas migratórias alternativas que são percorridas por uma variedade de organismos aquáticos (COSTA, 2021). Considerando o papel de afluentes como o rio Mogi-Guaçu, conhecer sua ictiofauna é essencial na manutenção e manejo de espécies. Peixes migradores são exemplos de organismos que mantêm a dinâmica dos rios e suas conexões. As mais frequentes do rio Alto Paraná e do complexo rio Grande-Pardo-Mogi pertencem às ordens Siluriformes e

Characiformes, ao representar 80% da riqueza de espécies de peixes dessa região (LANGEANI et al., 2007).

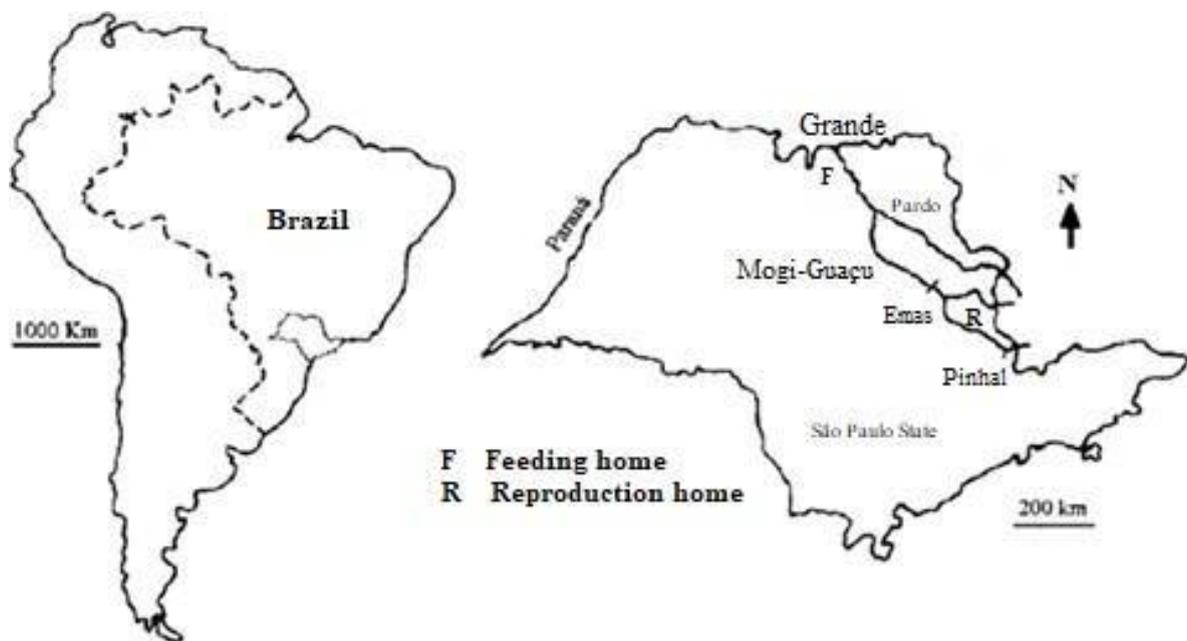


Figura 1. Mapa da América do Sul e do Estado de São Paulo ampliado, destacando os componentes das bacias dos rios Mogi-Guaçu, Pardo e Grande. São indicadas regiões à montante e à jusante deste complexo hidrográfico identificando áreas de reprodução (R) e de alimentação (F) da espécie *Prochilodus lineatus*. Fonte: Marlene Sofia Arcifa.

1.2 Peixes migradores continentais

Segundo Dingle (2006), o comportamento migratório pode ser observado em diversos grupos animais e consiste em uma estratégia reprodutiva e também para escapar de possíveis restrições quanto à disponibilidade de alimento (NORTHCOTE, 1978). Peixes migradores são capazes de percorrer vários habitats a curta, média ou

longa distância, à medida que se deslocam para fins reprodutivos ou tróficos. A direção da migração depende das condições locais e pode ser para a jusante (rio abaixo) ou para montante (rio acima). Os peixes migradores desempenham papel único no ecossistema onde estão inseridos, uma vez que enquanto migram podem transportar nutrientes, patógenos e parasitas, capazes de ligar habitats que não foram anteriormente conectados (BAUER & HOYE, 2014).

Um compilado de estudos sobre a migração de peixes no Rio Mogi-Guaçu vem sendo realizados desde a década de 70, com base em dados de marcações feitas entre os anos de 1954 e 1971, como descrito no livro “Peixes do Brasil” (GODOY, 1975). Com base nesses trabalhos, duas regiões prioritárias são diferenciadas dentro do ecossistema Mogi-Pardo-Grande, onde ocorrem processos de reprodução e de alimentação. O chamado “lar de reprodução” está situado no rio Mogi-Guaçu entre Cachoeira de Emas e Salto do Pinhal, que é ocupado durante a piracema, que ocorre no período entre novembro e fevereiro. A segunda região é nomeada como “lar de alimentação” e está situada na parte média do Rio Grande, mais especificamente entre a Cachoeira de Marimbondo e a barragem da Usina de Porto Colômbia. Essa região é ocupada entre janeiro e agosto, período de crescimento e engorda dos peixes.

A migração periódica leva os cardumes a perderem seu território de origem, fazendo com que muitos passem a residir a montante no rio (DINGLE, 2014). Contudo, a perda do comportamento migratório em uma população pode gerar alterações ainda pouco estudadas nas comunidades ecológicas (MILLS et al., 1993). Assim, compreender os mecanismos e a dinâmica dos cardumes é fundamental para o entendimento das bases do processo migratório e como as espécies são capazes de responder às interferências antrópicas, além de quais fatores interferem

para que ocorram mudanças comportamentais nas populações locais (DINGLE, 2006; BOLGER et al., 2008; CHAPMAN et al., 2011). Characiformes é uma das ordens mais predominantes na bacia do Alto paraná e no rio Mogi-Guaçu, e, dentro desta, as espécies migradoras que mais se destacam são o curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e o dourado (*Salminus brasiliensis*) (GODINHO & KYNARD, 2009).

A reproduo de espécies como o curimbatá e o dourado depende do regime hídrico da região que habitam, já que os ovos depositados se direcionam às margens durante a cheia dos rios para adentrar às lagoas marginais e dar origem às larvas. Além disso, outros fatores bióticos são relatados como gatilhos para o processo migratório em curimbatá, como turbidez da água e reduo da pressão atmosférica que antecede a chuva, uma vez que o gatilho reprodutivo envolve o nível de vazão dos rios (CELESTINO, 2018).

1.3 Descrio da espécie *Prochilodus lineatus*

Characiformes é a ordem mais dominante na bacia hidrográfica do Rio Paraná e está entre as mais diversas entre peixes Neotropicais. Cerca de 2.260 espécies estão divididas em 24 famílias e sustentam essa riqueza (FROESE & PAULY, 2015; LAVOU et al., 2017; BETANCUR-R et al., 2018; FRICKE et al., 2020). Dentre os gneros da ordem, *Prochilodus* se destaca por propriedades como abranger espécies detritívoras e, portanto, importantes na transferência de energia e ciclagem de nutrientes no ambiente (FLECKER, 1996). Assim, em numerosas populaes, as espécies detritívoras servem como fonte principal de alimento para espécies ictifagas ou carnívoras, na estrutura de componentes da cadeia trófica aquática

(BARRELA et al., 2001). A presença desses componentes aumenta a eficiência energética dentro da comunidade, podendo levar a um aumento na produtividade pesqueira (GOMES & MIRANDA, 2001; ALVIM & PERET, 2004).

A capacidade adaptativa de *Prochilodus* a diferentes ambientes faz com que algumas espécies do gênero sejam predominantes nos rios, lagoas ou reservatórios que habitam (MAIA et al., 1999). Segundo Taphorn (1992), as espécies do gênero podem representar grande fração da biomassa em determinadas localidades (BOWEN et al., 2022) e essa característica faz com que esses peixes sejam frequentemente explorados pela pesca continental, podendo levar a sobrepesca.

Na família Prochilodontidae, *Prochilodus lineatus* Valenciennes (1836) é uma das espécies mais amplamente distribuídas e recorrentes (figura 2). Popularmente conhecida como curimba, curimbatá e grutamã, trata-se de um peixe reofílico, que nada contra a correnteza a fim de reproduzir. A espécie habita as bacias dos rios Paraná, Paraguai e Paraíba do Sul (REIS et al., 2003) e é capaz de migrar longas distâncias ascendentes e laterais em rios tributários (BAYLEY, 1973; MAKRAKIS et al., 2012) quando chega à maturidade sexual, com cerca de 2 a 3 anos. O curimbatá possui hábito alimentar detritívoro (HAHN et al., 2004, BOWEN, 2022) e pode chegar a 70cm de comprimento total, apesar de diferenças morfométricas serem constatadas por pesquisadores (MACHADO e FORESTI, 2012), indicando a possível existência de estoques geneticamente distintos.



Figura 2. Exemplar adulto de *Prochilodus lineatus* Valenciennes (1836) (Fonte: Fishbase).

O curimatá é considerado um peixe migrador potamódromo de longa distância que é capaz de percorrer mais de 1.000km por ano e compõe extensos cardumes que migram nos rios da bacia do Alto Paraná durante a piracema (GODOY, 1962; MAKRAKIS et al., 2012). Ele se reproduz nos canais dos rios e seu desenvolvimento inicial ocorre em lagoas marginais na planície de inundação, até alcançar a maturidade e regressar ao rio após nova inundação. Enquanto os juvenis habitam lagoas marginais e tributários, os adultos vivem em águas correntes, realizam fecundação externa e desova total. A desova dos curimatás ocorre em água corrente nos trechos superiores dos grandes tributários, como nos componentes da bacia hidrográfica do Rio Paraná, no período de novembro a fevereiro, durante a piracema. A capacidade de migrar longas distâncias supõe que as espécies do gênero constituem uma única população panmítica (COLLINS et al., 2013).

No período reprodutivo, os peixes do complexo Mogi-Pardo-Grande formam cardumes e iniciam sua migração rio acima, partindo do Rio Grande em direção ao rio Pardo e posteriormente em direção ao Rio Mogi-Guaçu, até chegarem na área da Cachoeira de Emas, onde ocorrerá o processo de reprodução. Após atingirem o

objetivo, eles retornam em direção a jusante, ao “lar de alimentação” no Rio Grande. Um aspecto de interesse relatado por alguns autores nessa espécie é a periodicidade migratória, observada em vários exemplares marcados que foram recapturados na mesma região de soltura e época do ano em que foram realizadas as marcações (GODOY, 1975).

Cerca de 50 a 90% da biomassa total de peixes capturados nas porções baixas do Rio Mogi-Guaçu e regiões de inundação são curimbatás (FLECKER, 1996), que se comporta como uma das espécies mais capturadas no Rio Paraná, tanto em número quanto em biomassa (CORDIVIOLA & CAMPANA, 1993; BOWEN et al., 2022). A espécie apresenta um alto valor comercial para a pesca e isso tem despertado interesse para criação e reprodução em cativeiro pela facilidade de fecundação artificial, manejo e regime alimentar.

Apesar de numerosa, as populações naturais de curimbatá podem sofrer com as ações antrópicas como sobrepesca e destruição do ambiente ocupado pela espécie, visto que em regiões neotropicais as espécies potamódromas apresentam uma maior importância econômica. Além disso, a possível queda populacional também pode ser em resposta a contaminação dos rios por dejetos e despejos acidentais e pela construção de barragens para a instalação de usinas hidrelétricas (LOPERA-BARRERO et al., 2016; RIBOLLI et al., 2016).

Considerando o processo de migração uma resposta adaptativa às condições ambientais, variações climáticas potencialmente alteram as pressões seletivas sobre o comportamento das espécies. Essas variações podem interferir ou até mesmo interromper processos migratórios, entretanto, esse assunto ainda é pouco conhecido, principalmente com relação aos impactos que podem ser gerados (SHAW & MARTINS, 2016) pela formação de cardumes residentes. Assim, é

necessário a aplicação de estudos e medidas voltados ao manejo das espécies nativas migratórias que podem sofrer esse tipo de pressão.

1.4 Peixes migradores e residentes

Os peixes migradores desempenham função única no ecossistema, pois enquanto migram podem transportar nutrientes, patógenos e parasitas, capazes de ligar habitats que não foram anteriormente conectados (BAUER & HOYE, 2014). Duas regiões prioritárias são descritas dentro do ecossistema Mogi-Pardo-Grande: na parte média do rio Grande os cardumes nadam a jusante a fim de se alimentar, e na região entre Cachoeira de Emas e Salto do Pinhal os cardumes migram a montante durante a piracema para completar seu ciclo reprodutivo.

A relação entre a piracema e o início da migração no ciclo reprodutivo se deve a mudança e nos pulsos de inundação, que geralmente ocorrem nesse período. Assim, os peixes migradores sofrem diversas influências abióticas e estão diretamente relacionados ao ambiente em que estão inseridos. A importância de espécies migradoras para o habitat faz com que esses peixes sejam alvo de importantes estudos biológicos atualmente. Ao migrar, os peixes que se deslocam perdem seu território de origem para outras espécies que passam a ocupá-lo, assim, os peixes podem habitar apenas uma região durante seu ciclo de vida e perder o hábito migratório (DINGLE, 2014).

Cardumes de peixes residentes já vem sendo identificados por estudos em algumas populações de espécies migradoras, como *Salminus brasiliensis* (conhecido como dourado), *Prochilodus lineatus* (curimbatá) e *Salmo salar* (salmão).

Em populações de *S. brasiliensis* do rio Uruguai, 40% de peixes marcados por telemetria permaneceram à jusante da barragem de Itá por períodos prolongados, indicando assim a presença de populações residentes nesta região em uma pesquisa realizada por Hahn et al. (2007).

Essa variação no comportamento dos peixes pode levar a alterações na dinâmica reprodutiva e conseqüentemente, na genética de espécie. Rossini (2010) por exemplo, observou diferenças genéticas entre cardumes de residentes e migradores de dourados coletados em Cachoeira de Emas, SP, ao aplicar marcadores moleculares microssatélites em cardumes da região. Além disso, Machado (2007) concluiu que peixes residentes costumam ser mais velhos quando comparados aos migradores, ao analisar as escamas e verificar que o número médio de anéis etários encontrados variou de 2 a 5, e que existe uma diferença no padrão morfométrico entre ambos (MACHADO & FORESTI, 2012). Contudo, poucas diferenças foram relatadas até hoje entre migradores e residente além das mencionadas, principalmente a nível genético.

Essa distinção, no entanto, já é bem relatada para peixes em regiões temperadas, onde vários estudos demonstram a existência de populações simpátricas residentes e migradoras anadrômicas ao longo de bacias estudadas (KLEMETSEN et al. 2002; NARUM et al. 2004; KARVE et al. 2008). Para peixes de águas continentais, no entanto, esses estudos são escassos. Quando consideramos a ictiofauna neotropical, a falta desses trabalhos é ainda maior, uma vez que estudos populacionais que esclareçam a dinâmica comportamental entre peixes migradores e residentes nas espécies dessa região são pouco explorados, o que torna necessário o desenvolvimento de trabalhos robustos analisando os peixes sob ponto de vista genético-populacional (MACHADO et al. 2007).

Com o respaldo da genética de populações, tem-se revelado que peixes migradores de água doce, sem nenhuma barreira evidente separando estoques, podem apresentar estruturação populacional, com duas ou mais populações genéticas coexistentes em um único sistema hidrográfico (WIRTH & BERNATCHEZ 2001; NARUM et al. 2006). Esse fato é ainda mais relevante quando consideramos que cerca de 39% das espécies de peixes do rio Alto Paraná são migradoras.

Frequentemente os estudos populacionais são empregados com outras finalidades, trabalhos envolvendo genética de espécies migradoras importantes ecologicamente, como o curimatá, foram desenvolvidos com o uso de ferramentas moleculares ao longo das últimas décadas tanto para medir a diversidade genética dos estoques (OLIVEIRA, 2018; PENITENTE, 2018; COSTA, 2021;), como envolvendo as características citogenéticas e presença de cromossomos B (PORTO-FORESTI, 2018).

A pamicidade e outras informações sobre espécies migradoras e residentes como o curimatá podem ser corroboradas através do uso de ferramentas moleculares refinadas, como os SNPs. Elas podem ser aplicadas para avaliar a variabilidade genética dos indivíduos da espécie, a formação e organização dos cardumes e o grau de parentesco das populações dos estoques em determinados ambientes, além da problemática já mencionada entre migradores e residentes.

1.5 Análises de diversidade genética e peixes Neotropicais

Considerando o crescente avanço da tecnologia genômica nas últimas décadas, várias ferramentas moleculares têm sido desenvolvidas a fim de expandir o

conhecimento acerca das metodologias genéticas e sua aplicação nos programas de conservação dos estoques naturais. Os marcadores moleculares apresentam um expressivo potencial para serem empregados em inúmeras análises, muitas ainda pouco exploradas. Relações filogenéticas, estruturação genética, biodiversidade e potencial adaptativo das espécies e populações são alguns dos temas que os marcadores podem abordar em uma diversidade de organismos (ALLENDORF et al., 2010; BRANDIES et al., 2019).

O sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) provocou uma revolução genômica ao propiciar a identificação de marcadores mais eficientes, permitindo a abrangência e aprofundamento nos conhecimentos sobre estudos populacionais em peixes (MASTROCHIRICO-FILHO, et al., 2018). Os microssatélites são exemplos de marcadores polimórficos que fornecem informações como estrutura e variabilidade genética das populações de maneira confiável. Entretanto, limitações como o risco de homoplasia para o tamanho de alelos, presença de alelos nulos (ZHANG & HEWITT, 2003; PUTMAN & CARBONE, 2014) e número insuficiente de loci polimórficos nas espécies estudadas podem limitar a confiabilidade dos resultados (LEMOPOULOS et al., 2018).

Assim, além dos microssatélites, outros marcadores moleculares como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) ou polimorfismo de nucleotídeo único, são considerados mais eficientes atualmente e têm sido utilizados na identificação da diversidade genética de peixes Neotropicais (MASTROCHIRICO-FILHO et al., 2018). Eles constituem uma variação na sequência de DNA que afeta apenas uma base em uma sequência do genoma, tanto em regiões codificantes quanto não codificantes (BRUNEAUX et al., 2013).

Os SNPs podem ser obtidos a partir do sequenciamento de DNA associado ao local de restrição utilizando o sistema de sequenciamento Illumina (MILLER, 2008). Os fragmentos de DNA da amostra de um indivíduo são ligados a um adaptador modificado contendo uma sequência de identificação e os fragmentos de vários indivíduos da mesma espécie podem ser analisados em conjunto e sequenciados em um único processo. Dessa forma, o sequenciamento consegue fornecer uma plataforma flexível e pode produzir milhares de loci simultaneamente, mesmo para espécies sobre as quais não haja genoma de referência. Neste caso, o processo se apresenta como uma alternativa válida para ser utilizado nas análises de espécies e populações que detêm uma limitada variação de microssatélites.

Segundo Liu e Cordes (2004), os SNPs são considerados os marcadores mais aptos à genotipagem de automação e capazes de revelar polimorfismos ocultos não detectados por outros marcadores moleculares. Além disso, apresentam uma baixa taxa de mutação em comparação com àquelas de outros marcadores (ANDREWS et al., 2016; LEMOPOULOS et al., 2018). Vantagens na inferência de haplótipos e análises estatísticas tornam os SNPs uma ferramenta genética com um custo/benefício viável para estudos evolutivos (ALLENDORF et al., 2010; ANDREWS et al., 2021), fazendo com que essa metodologia possa ser aplicada em grande escala e com alto rendimento quando comparada com aquelas que se utilizam demais marcadores moleculares utilizados (ZIMMERMAN et al., 2020).

Existe uma escassez de estudos que utilizam novas tecnologias como os SNPs nos programas de conservação de espécies Neotropicais de água doce. Análise de estrutura genética de populações com esse marcador é realizada com frequência em peixes marinhos, como observado no trabalho de PRADO et al. (2018). Trabalhos que abordam aspectos da genética populacional em peixes continentais

têm sido mais comuns e são realizados desde a década de 90. Entretanto, quase que em sua totalidade, estes têm sido realizados com o uso de marcadores do tipo microssatélites, descrevendo o comportamento desses marcadores também em curimatás. Logo, é importante que novas pesquisas sejam realizadas utilizando o mapeamento de SNPs devido a sua eficiência e amplitude, para compreensão dos padrões migratórios, conservação e manejo de espécies continentais.

Atualmente, dados que expliquem a influência de cardumes residentes em uma espécie migradora entre os peixes Neotropicais são inexistentes, bem como informações a respeito da origem desse comportamento. Caso os indivíduos residentes já tenham sido migradores em seu ciclo de vida, ainda não se sabe o que levou a essa mudança comportamental. Assim, a organização e a formação desses cardumes ainda são pouco conhecidas, apesar de significantes para o entendimento da evolução e organização das populações.

A capacidade de formação de cardumes residentes pode indicar a existência de dois estoques potencialmente distintos geneticamente em uma espécie. Nesse caso, a atuação de ações antrópicas incidindo nesses estoques poderia determinar modificações estruturais e significativas nas populações locais, com efeitos consequentes sobre a diversidade genética de espécies como *P. lineatus*. Nesse contexto, estudos voltados à análise populacional de espécies migradoras e residentes são essenciais para a compreensão da estrutura e dinâmica dos cardumes de espécies consideradas modelo, como o curimatá, devido às particularidades das populações, como importância no ecossistema das bacias hidrográficas que compõem o complexo sistema do Alto Paraná, a existência dos cardumes migradores e residentes e sua abundância nas bacias.

2 OBJETIVOS

Considerando a relevância das espécies migradoras reofílicas para o ecossistema, o objetivo do trabalho foi investigar a possível existência de estruturação entre e dentro dos estoques de migradores e residentes da espécie *P. lineatus* durante os períodos reprodutivos, na região de Cachoeira de Emas, no rio Mogi-Guaçu, utilizando pela primeira vez a identificação por marcadores SNPs. Para responder a esse objetivo, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- 1) Desenvolver e identificar novos marcadores SNPs da espécie *P. lineatus* por meio de Sequenciamento de Nova Geração (NGS);

- 2) Realizar um estudo temporal em cardumes migradores e residentes e identificar a possível existência de estruturação genética que afetem o estoque de *P. lineatus* no rio Mogi-Guaçu;

- 3) Analisar a diversidade genética de migradores e residentes da espécie *P. lineatus* no rio Mogi-Guaçu.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Os curimatás *Prochilodus lineatus* Valenciennes (1836) foram coletados na região da Cachoeira de Emas, município de Pirassununga (SP), localizada à montante do Rio Mogi-Guaçu (figura 3A). As amostras coletadas nos anos de 2008, 2009 e 2010 foram cedidas pelo Laboratório de Genética e Reprodução de Peixes, do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental CEPTA, em Pirassununga (SP), obtidas de exemplares que foram capturados com tarrafas de malhas de 8, 9, 10, 11 e 12 cm entre nós adjacentes (figura 3B). As amostras de exemplares migradores do ano de 2021 foram coletadas na região da Topava e dos residentes acima da barragem, nas coordenadas 21°55'34,35"S e 47°22'02,02"O, utilizando as mesmas tarrafas.



Figura 3. Rio Mogi-Guaçu, região de Cachoeira de Emas, Pirassununga (SP).

A amostragem utilizada nesse estudo constou de material obtido de 10 indivíduos migradores coletados durante o período reprodutivo entre outubro e dezembro e 10 indivíduos residentes, coletados entre junho e agosto em cada um dos anos de 2008, 2009, 2010 e 2021 (tabela 1), totalizando 80 indivíduos analisados. Fragmentos de tecidos de cerca de 2cm das nadadeiras de cada exemplar foram condicionadas em microtubos de 1,5ml e submersas em álcool absoluto para conservação do material biológico, sendo então transportadas para análises no Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE) na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus Bauru, SP.

3.2 Extração de DNA

O DNA genômico de cada indivíduo foi extraído da nadadeira com o Kit PureLink Genomic DNA Purification (ThermoFisher Cientific, EUA), utilizando o protocolo fornecido pelo kit de extração *in silica*. Realizada a extração, as amostras foram observadas através da eletroforese em gel de agarose 1% corando-as com fluorescente GelRed™ 1X (Uniscience) e visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia) a fim de verificar a qualidade do DNA e da extração. Em seguida, cada amostra foi quantificada utilizando o Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) com o Qubit™ dsDNA BR Assay Kit para analisar a concentração do DNA, homogeneizando 198 µl de mix (contendo 199 µl de buffer e 1 µl de fluorescência, ambos fornecidos pelo kit) e 2 µl de extração de DNA. Após as etapas de quantificação, cada amostra foi padronizada para uma concentração final de 200 ng/µl.

3.3 Construção das bibliotecas

Dupla digestão enzimática (Double digest)

A construção das bibliotecas foi realizada utilizando o protocolo de sequenciamento/genotipagem de SNPs (ddRAD-seq, *double digest Restriction Associated DNA sequencing*), descrito por Peterson et al. (2012) e adaptado por Campos et al. (2017), onde são utilizadas duas enzimas de restrição. Basicamente, o protocolo foi dividido em quatro tópicos principais (dupla digestão enzimática, ligação dos adaptadores, indexação e pool das amostras e size selection). Para a reação digestão, foram utilizados 34 μL de DNA total, 1,0 μL de enzima EcoRI de corte frequente (20U/ μL), 1,0 μL da enzima MspI de corte raro (10U/ μL) e 4 μL de tampão, nesse caso o *Cut Smart*. A solução de volume final de 40 μL foi incubada durante 3 horas à 37°C. Em seguida, o material digerido foi purificado com *beads* do kit ProNex® Size-Selective Purification System (figura 4 A) e o material foi quantificado com o *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit* para análise do padrão de concentração/ μL .

Ligação dos adaptadores

A ligação de dois adaptadores hibridizados específicos foi feita especificamente para o conjunto de enzimas que se ligaram às extremidades das sequências (31,5 μL produto da digestão) através da incubação a temperaturas previamente padronizadas, juntamente com 0,5 μL de T4 ligase, 4,0 μL de T4 ligase Buffer e 2 μL do adaptador de cada uma das enzimas (P1 e P2). As amostras foram incubadas a uma temperatura de 23°C por 30 minutos, de 65°C por 10 minutos e de 63°C por 90

segundos, sendo então a temperatura diminuída de 2°C a cada 90 segundos, até alcançar 23°C. O produto da incubação foi purificado novamente com o kit de *beads* e foi feita a quantificação para controle de concentração de DNA.

Indexação

A indexação das amostras foi feita através da inserção da sequência de complemento Nextera® Index Primers (Illumina, San Diego EUA) i5 e i7 (Nextera DNA CD Indexes – 96 indexes, 96 amostras) em cada amostra. Para a reação, utilizou-se 12,5 µL de Go Taq® Master Mixes (Promega), 2,5 µL de cada index i5 e i7 (em cada amostra uma combinação diferente) e 7,5 µL de amostra. A PCR foi feita com um passo inicial de 72°C durante 3 minutos, 16 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos e 95°C por 10 segundos, anelamento (55°C por 30 segundos), extensão (72°C por 30 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Em seguida, os fragmentos foram purificados com o kit de *beads* (figura 4 B) e quantificados, normalizadas a 30 ng/µL.

Pool das amostras e size selection

Na concentração de 30 ng/µL, 3 µL de cada amostra foi retirado e utilizado para compor o pool, que teve um volume final de 240 µL. A purificação do pool (figura 4 C) foi realizada utilizando o kit de *beads*, de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, afim de selecionar o tamanho dos fragmentos de interesse, foi feito o *size selection*. Para tal, o *pool* foi aplicado em gel de agarose 1% e, ao fim da eletroforese (50min), a região de 300 bp a 500 bp foi cortada e purificada

posteriormente com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA), seguindo instruções do fabricante.

Após a purificação, a biblioteca foi quantificada em PCR em tempo real (qPCR) e posteriormente levada ao sequenciador NGS Illumina Nextseq50 onde foi sequenciada com leituras de extremidade única (*singleend*) em uma *flow cell mid*. Esse procedimento foi realizado no Instituto de Biotecnologia (IBTEC – UNESP, campus Botucatu/SP), em colaboração com a equipe do Prof. Dr. Paulo Eduardo M. Ribolla.



Figura 4. Construção das bibliotecas utilizando o protocolo de sequenciamento/genotipagem de SNPs. Em **A)** Quantificação das amostras, em **B)** Purificação com *beads* e em **C)** Purificação do *pool* com *beads*.

3.4 Análises de bioinformáticas

Após o sequenciamento, o programa *FastQC* (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/) foi utilizado a fim de se verificar a

qualidade dos *reads*. Em seguida, os *reads* de baixa qualidade foram removidos utilizando o módulo *process_radtags* incluso do programa *STACKS v 2.1*. (Catchen et al., 2011).

Para o rastreamento de SNPs foram utilizados parâmetros de M=1 a M=9, para determinar o melhor para controlar o número de incompatibilidades entre dois alelos de um loci, optando-se pelo M=4 e pelo M=3 que tem a função de identificar o número mínimo de leituras idênticas necessárias para iniciar um possível alelo. Para realização da filtragem dos SNPs, foi utilizado o *populations* selecionando os que genotiparam em pelo menos 70% de cada população ($r = 0,7$).

Como não há genoma de referência para *P. lineatus*, a montagem dos *loci* para identificação dos SNPs foi realizada por meio dos seguintes módulos oferecidos pelo programa *STACKS*: *ustacks* (que empilha as sequências e as alinha em pilhas exatamente correspondentes, comparando-as através de uma estrutura de máxima verossimilhança); *cstacks* (monta um catálogo a partir de amostras processadas pelo *ustacks* criando um conjunto de loci consenso); *sstacks* (conjuntos de loci putativos, construídos pelo programa *ustacks* que podem ser pesquisados em um catálogo produzido por *cstacks*).

Finalizada essa etapa, foi utilizado o programa *tsv2bam* também do *STACKS*, que transpôs os dados orientando-os por locus, em vez de por amostra. Em seguida, o *gstacks* foi empregado para identificar SNPs dentro da população para cada locus e, em seguida, cada indivíduo foi genotipado em cada SNP identificado.

O software *PLINK 1.9* cog-genomics.org foi utilizado para aplicar os de controle de qualidade excluindo SNPs que não passaram nos seguintes critérios: genótipos ausentes ($geno < 0,2$), $mind < 0,2$ e frequência de alelos menores ($MAF < 0,05$).

Finalmente, os SNPs filtrados estavam presentes em pelo menos 70% dos indivíduos de uma população (taxa de chamadas > 0,70). As variantes resultantes foram filtradas para considerar apenas um SNP por locus. Heterozigosidade esperada (H_E) e a Heterozigosidade observada (H_O) também foram calculadas no Plink. O Desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado no software GENEPOP (ROUSEET, 2008).

Com a finalidade de analisar a diferenciação genética entre as populações foram também calculados os valores de F_{ST} *pairwise* e o AMOVA (análise de variância molecular) pelo programa ARLEQUIN v3.5.2.2 (EXCOFFIER, et al., 2010). O coeficiente de endogamia (F_{IS}) foi estimado usando o pacote R hierfstat (GOUDET & JOMBART, 2015). Uma análise discriminante de componentes (Discriminant Analysis of Principal Components - DAPC) (JOMBART & AHMED, 2011) também foi realizada para estimar os clusters genéticos através do programa estatístico R. Esta análise foi implementada no pacote adegenet do R (JOMBART & AHMED, 2011) e o número 25 apropriado de clusters genéticos foi determinado utilizando critérios de informação bayesiana (Bayesian Information Criterion - BIC).

Foi realizada uma análise bayesiana utilizando o programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000) a fim de verificar o número de clusters genéticos distintos na amostra (K) e identificar estrutura genética. Foram testados valores de K=1 a 9 e 10 *runs* em todas as amostras. Em todos os testes foram utilizados 10.000 de *burn in* e 10.000 MCMC.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão estão descritos e discutidos a seguir em um capítulo em formato de artigo. As referências bibliográficas encontram-se ao final da dissertação, bem como o material complementar elaborado.

Capítulo

Identificação de SNPs e genética populacional de cardumes migradores e residentes de *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae).

Identificação de SNPs e genética populacional de cardumes migradores e residentes de *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae).

Resumo

Conhecida como curimba ou curimbatá, *Prochilodus lineatus* é uma importante espécie migradora que compõe extensos cardumes que migram durante a piracema, auxiliando na manutenção da diversidade biológica. A existência de cardumes residentes, entretanto, tem sido observada e, diante da escassez de trabalhos afim de compreender esses grupos e suas possíveis problemáticas (como queda da variabilidade genética), o objetivo desse trabalho foi identificar marcadores moleculares SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) para a espécie, e aplicá-los em estudos populacionais direcionados a cardumes migradores e residentes, a fim de se avaliar a diversidade e uma possível estruturação genética entre ambos estoques. Exemplares foram coletados e 80 amostras de curimbatás, sendo 10 indivíduos migradores, e 10 residentes, nos anos 2008, 2009, 2010 e 2021, foram sequenciadas pela tecnologia de sequenciamento de nova geração (ddRAD-seq). Após a construção dos *loci* e etapas de filtragens, 4.085 SNPs foram utilizados nas análises populacionais. Para todos os anos, os valores da heterozigosidade observada (H_o) foram semelhantes aos da heterozigosidade esperada (H_e) e os valores de F_{IS} indicaram a presença de um nível de endogamia e o Hwe indicou um excesso de homozigotos. Os valores de F_{ST} indicaram a existência de agrupamentos entre os residentes de 2008 e 2021, enquanto os migradores demonstraram uma maior homogeneização de clusters. O AMOVA indicou a maior diferenciação entre indivíduos dentro das populações, mas uma significativa diferenciação entre grupos. Sendo assim, é possível concluir que os grupos de migradores se mostram com diversidade genética, enquanto os de residentes podem estar apresentando um princípio de estruturação, que será evidenciado nos próximos anos com a queda prevista do número efetivo populacional, fazendo com que seja necessário o monitoramento dos curimbatás do rio Mogi-Guaçu para que não haja perda da variabilidade genética nos cardumes.

Palavras-chave: marcadores moleculares; peixes neotropicais; SNPs.

Abstract

Known as curimba or curimbatá, *Prochilodus lineatus* is an important migratory species that makes up extensive shoals that migrate during spawning, helping to maintain biological diversity. The existence of resident shoals, however, has been observed and, given the scarcity of studies in order to understand these groups and their possible problems (such as a decrease in genetic variability), the objective of this work was to identify molecular markers SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) for the species, and apply them in population studies directed to migratory and resident shoals, in order to evaluate the diversity and a possible genetic structuring between both stocks. Specimens were collected and 80 samples of curimbatás, being 10 migratory individuals, and 10 residents, in the years 2008, 2009, 2010 and 2021, were sequenced by next-generation sequencing technology (ddRAD-seq). After building the loci and filtering steps, 4085 SNPs were used in the population analyses. For all years, observed heterozygosity (H_o) values were similar to expected heterozygosity (H_e) values and F_{IS} values indicated the presence of a level of inbreeding and H_{WE} indicated an excess of homozygotes. The F_{ST} values indicated the existence of clusters between the residents of 2008 and 2021, while the migrants showed a greater homogenization of clusters. AMOVA indicated the greatest differentiation between individuals within populations, but a significant differentiation between groups. Therefore, it is possible to conclude that the migratory groups show genetic diversity, while the resident groups may be presenting a structuring principle, which will be evidenced in the coming years with the expected drop in the effective population number, making it necessary to monitoring of the curimbatás of the Mogi-Guaçu river so that there is no loss of genetic variability in the shoals.

Keywords: molecular markers; neotropical fish; SNPs.

INTRODUÇÃO

A bacia do Alto Paraná é o segundo maior sistema de drenagem da América do Sul e é responsável por grande parte da diversidade aquática no Brasil. O rio Mogi-Guaçu é um dos principais afluentes da bacia do Alto Paraná (MMA, 2019) e tem um papel singular no que diz respeito à conservação de espécies aquáticas, uma vez que, juntamente com o rio Pardo, são locais favoráveis para desova e, portanto, são

berçários para diversos peixes (SILVA et al., 2017; LOPES et al., 2019), além de estarem em rota para espécies migradoras (COSTA, 2021). Há décadas a migração é um comportamento observado em peixes, habitualmente com finalidades tróficas ou reprodutivas (DINGLE, 1975; NORTHCOTE, 1978; DINGLE, 2014).

Os peixes migradores desempenham função única no ecossistema, pois enquanto migram podem transportar nutrientes, patógenos e parasitas, capazes de ligar habitats que não foram anteriormente conectados (BAUER & HOYE, 2014). Duas regiões prioritárias são descritas dentro do ecossistema Mogi-Pardo-Grande: na parte média do rio Grande os cardumes nadam a jusante a fim de se alimentar, e na região entre Cachoeira de Emas e Salto do Pinhal os cardumes migram a montante durante a piracema para completar seu ciclo reprodutivo. Ao migrar, os peixes que se deslocam perdem seu território de origem para outras espécies que passam a ocupá-lo, assim, os peixes podem habitar apenas uma região durante seu ciclo de vida e perder o hábito migratório (peixes residentes) (DINGLE, 2014). Contudo, a perda desse comportamento pode modificar geneticamente as populações e todo o ecossistema (MILLS et al., 1993). Uma das espécies em que essa característica já é observada é *Prochilodus lineatus* Valenciennes (1836).

Conhecida popularmente como curimba ou curimbatá, *P. lineatus* é um peixe migrador reofílico de longas distâncias que pode atingir 70cm de comprimento e compõe extensos cardumes que migram nos rios da bacia do Alto Paraná durante a piracema (GODOY, 1962; MAKRAKIS et al., 2012; STEPHEN, 2022; STEPHEN, 2022). É uma das espécies mais capturadas no rio Paraná (CORDIVIOLA & CAMPANA, 1993; STEPHEN, 2022), tanto em número quanto em biomassa. Sua fácil adaptação a criação e produção em cativeiro fazem com que o curimba apresente um alto valor comercial.

Estudos populacionais ainda não foram empregados para analisar a possível formação de estoques geneticamente distintos entre migradores e residentes e a dinâmica comportamental dessa espécie, apesar de autores como Machado e Foresti (2012) terem observado variação no padrão morfométrico em indivíduos desses grupos. Assim, o desenvolvimento de trabalhos robustos analisando os peixes sob ponto de vista genético-populacional é essencial (Machado et al. 2007).

Marcadores moleculares são ferramentas altamente eficientes para essas e outras finalidades, dando embasamento e confiabilidade em estudos populacionais. A pamicidade e outras informações sobre espécies migradoras e residentes como o curimatá podem ser corroboradas através do uso de marcadores mais específicos, como os SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único). Eles podem ser aplicados para avaliar a variabilidade genética das populações, a formação e organização dos cardumes e o grau de parentesco das populações dos estoques em determinados ambientes.

Os SNPs estão atualmente entre os marcadores genéticos mais eficientes, principalmente no que se refere a estudos populacionais aplicados a peixes Neotropicais (MASTROCHIRICO FILHO et al., 2018), entretanto, ainda são mais voltados para peixes marinhos (CAMPOS, 2021). Apesar da alta eficiência, outros marcadores, como os microssatélites, ainda ganham mais espaço em estudos com peixes de água doce (OLIVEIRA, 2018). Sendo assim, a identificação de marcadores do tipo SNPs em uma espécie contribui para conhecimento de sua biologia e em estudos evolutivos, além de ser um método inovador.

Logo, é importante que novas pesquisas sejam realizadas para identificação de SNPs em espécies de peixes Neotropicais para uma melhor compreensão dos padrões migratórios e conservação de espécies continentais, como *Prochilodus lineatus*. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar através da genética populacional se existe estruturação genética entre estoques de migradores e residentes e diversidade genética, através da identificação dos primeiros SNPs para a espécie, utilizando amostras coletadas em diferentes anos, para melhor interpretar a dinâmica de formação dos cardumes e a influência do comportamento migratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e local de estudo

Os exemplares foram coletados em Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP, a montante do rio Mogi-Guaçu. As amostras dos anos de 2008, 2009 e 2010 foram cedidas pelo 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 (CEPTA), que foram pescadas com tarrafa. As amostras de migradores do ano de 2021 foram coletadas na região da Topava e de residentes acima da barragem, nas coordenadas 21°55'34,35"S e 47°22'02,02"O, utilizando o mesmo material. Assim, 10 exemplares de migradores foram coletados entre outubro e dezembro (período reprodutivo) e 10 exemplares de residentes coletados entre junho e agosto, em cada um dos anos (2008, 2009, 2010, 2021), totalizando 80 amostras. Após a coleta de um fragmento de nadadeira de cada, estas foram condicionadas em microtubos de 1,5ml submersas em álcool absoluto.

Tabela 1. Cardumes divididos por ano e identificação utilizada para as análises, sendo 10 indivíduos coletados por grupo.

Amostras	2008	2009	2010	2021	Total
Cardumes de migradores	08M	09M	10M	21M	40
Cardumes de residentes	08R	09R	10R	21R	40

Extração de DNA e construção de biblioteca de SNPs

O DNA genômico de cada indivíduo foi extraído da nadadeira com o *Kit PureLink Genomic DNA Purification* (ThermoFisher Cientific, EUA), utilizando o protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras foram observadas através da eletroforese em gel de agarose 1% com corante fluorescente GelRed™ 1X (Uniscience) e visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia) a fim de verificar a qualidade do DNA e da extração e, em seguida, as amostras foram quantificadas no *Qubit 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) com o Qubit™ dsDNA BR Assay Kit para analisar a concentração do DNA. Após as etapas de quantificação, cada amostra foi padronizada para uma concentração final de 200ng/ul.

Para caracterizar os marcadores moleculares SNPs, foi realizada a construção das bibliotecas de ddRADseq (*double digest Restriction Associated DNA sequencing*), para a espécie *Prochilodus lineatus*, utilizando o protocolo descrito em

Campos et al. (2017), seguindo as diretrizes originais de Peterson et al. (2012), onde utilizam-se duas enzimas de restrição (EcoRI e MspI). A purificação de todas as etapas foi efetuada com *beads* do kit ProNex® Size-Selective Purification System e a indexação das amostras foi feita através da inserção da sequência de complemento Nextera® Index Primers (Illumina, San Diego EUA) i5 e i7. Afim de selecionar o tamanho dos fragmentos de interesse, foi feito o size selection do pool de amostras selecionando a região de 300pb a 500pb, que foi purificado. A biblioteca foi quantificada em PCR em tempo real (qPCR) e posteriormente sequenciada pelo NGS Illumina Nextseq50 com leituras de extremidade única (single end) em uma flow cell mid. O resultado do sequenciamento foi empregado nas análises bioinformáticas em seguida.

Análise bioinformática e populacional

O programa *FastQC* (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/) foi utilizado a fim de verificar a qualidade de *reads* e foram removidos os com score Q < 20 utilizando o módulo *process_radtags* incluso no programa *STACKS v 2.1*. (Catchen et al., 2011). Como não há genoma de referência para curimatá, a montagem dos *loci* para identificação dos SNPs foi realizada utilizando o método *de novo* oferecido pelo mesmo programa, onde para o rastreamento de SNPs utilizou-se parâmetros de M=3 e m=3, que foram os melhores valores para controlar o número de incompatibilidades entre dois alelos de um loci e identificar o número mínimo de leituras idênticas necessárias para iniciar um possível alelo, respectivamente. Para realização da filtragem dos SNPs, foi utilizado o *populations*, selecionando os que genotiparam em pelo menos 70% de cada população ($r = 0,7$).

O software PLINK 1.9 (PURCELL et al., 2007), cog-genomics. foi utilizado para filtros de controle de qualidade, excluindo SNPs que não passaram nos seguintes critérios: genótipos ausentes ($geno$) < 0,2, $mind$ < 0,2 e frequência de alelos menores (MAF) < 0,05. As variantes resultantes foram filtradas para considerar apenas um SNP por locus. Heterozigosidade esperada (H_E) e a Heterozigosidade observada (H_o) também foram calculadas no Plink. O Desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado no software GENEPOP (ROUSSET, 2008).

Para analisar a diferenciação genética entre as populações foram também calculados os valores de F_{ST} *pairwise* e o AMOVA (análise de variância molecular) pelo programa ARLEQUIN v3.5.2.2 (EXCOFFIER et al., 2010). O coeficiente de endogamia (F_{IS}) foi estimado usando o pacote R hierfstat (GOUDET & JOMBART, 2015). A análise discriminante de componentes (Discriminant Analysis of Principal Components - DAPC) (JOMBART & AHMED, 2011) também foi realizada para estimar os clusters genéticos através do programa estatístico R. A análise foi implementada no pacote adegenet do R (JOMBART & AHMED, 2011) e o número 25 apropriado de clusters genéticos foi determinado utilizando critérios de informação bayesiana (Bayesian Information Criterion - BIC). O número efetivo populacional (N_e) foi calculado para estimar as condições das futuras gerações da espécie.

As amostras foram analisadas separando peixes migradores e residentes, a fim de analisar a possível existência de estoques geneticamente distintos entre esses grupos, que também foram analisados por ano. Foi realizada uma análise bayesiana utilizando o programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000) a fim de verificar o número de clusters genéticos distintos na amostra (K) e identificar estrutura genética. Foram testados valores de $K=1$ a $K=9$ e 10 runs no grupo de amostras de residentes, e o mesmo para o grupo de amostras de migradores. Em todos os testes foram utilizados 30.000 de *burn in* e 30.000 MCMC. Os valores de K foram selecionados usando o delta K (EVANNO et al., 2005) em Structure Harvester.

RESULTADOS

Identificação e filtragem de SNPs

Após a realização do sequenciamento, um total de 40.006.386 sequências brutas foram obtidas (material suplementar). De maneira geral, os grupos de 2008 foram os mais representativos em número de sequências (6.239.617 de sequências em migradores e 5.805.513 residentes), enquanto 2021 foi o ano com menor número de sequências, tanto para migradores (3.568.942) quanto para residentes (3.285.187). As filtrações realizadas por *process radtags* permitiram a exclusão de *reads* de baixa qualidade, bem como dos adaptadores e *phyx* que havia sido

adicionado às sequências. Em seguida, as filtrações empregadas com o Stacks realizaram o empilhamento de sequências e identificação dos mais prováveis SNPs. Ao final dessas etapas, o *populations* gerou 40.288 SNPs (figura 5).

As filtrações foram aplicadas igualmente para a população de migradores e residente através do software PLINK 1.9 e para cada uma das oito populações, separadas por ano. Após a filtração *mind*, alguns indivíduos foram excluídos da análise, sendo uma amostra residente do ano de 2008 e uma de 2021 e uma amostra de migradores de 2008 e duas de 2021. Ao final das filtrações de marcadores, obteve-se 4.085 SNPs, que foram utilizados para as análises populacionais descritas a seguir.

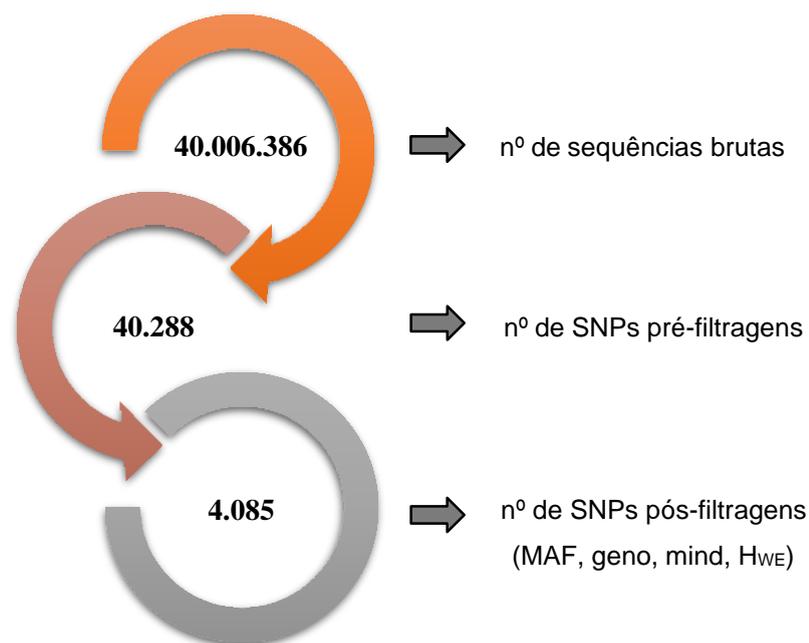


Figura 5. Relação de número de sequências e SNPs obtidos após as principais etapas de filtração das amostras de *Prochilodus lineatus*.

Análises de diversidade genética

Durante as etapas de filtrações para a obtenção de SNPs para a espécie de *P. lineatus*, dois indivíduos do cardume de migradores (de 2021) foram excluídos e dois de residentes (sendo um de 2008 e um de 2021) ao longo das análises, após a aplicação da filtração *mind*. Isso ocorreu devido à baixa qualidade das sequências geradas pelas amostras, portanto, foram eliminadas das análises. Na filtração

realizada separando os cardumes por ano, com exceção do ano de 2008, todos os anos posteriores apresentaram um número de SNPs maior entre migradores quando comparado aos residentes. No ano de 2021 essa variação foi mais representativa, indicando um número de SNPs 58% maior do que os migradores do mesmo ano.

Os valores de heterozigidade esperada (H_E) e observada (H_O) estão representados na tabela 2, com seus respectivos desvios padrão, onde a proximidade entre os valores de heterozigidade esperada (H_E) e heterozigidade observada é notável quando comparados, esse padrão ocorre em todos os anos amostrados. Entretanto, é possível identificar que a H_O foi ligeiramente menor do que a esperada em todos os anos amostrados, sem exceção. A diversidade genética foi semelhante e significativa, e os migradores de 2010 foi o grupo com maior heterozigidade. O valor de F_{IS} , que foi calculado através do software Hierfstat forneceu os dados apresentados na mesma tabela (também foram significativos) e indicam que, nesses cardumes, há uma baixa, mas existente, incidência de endogamia.

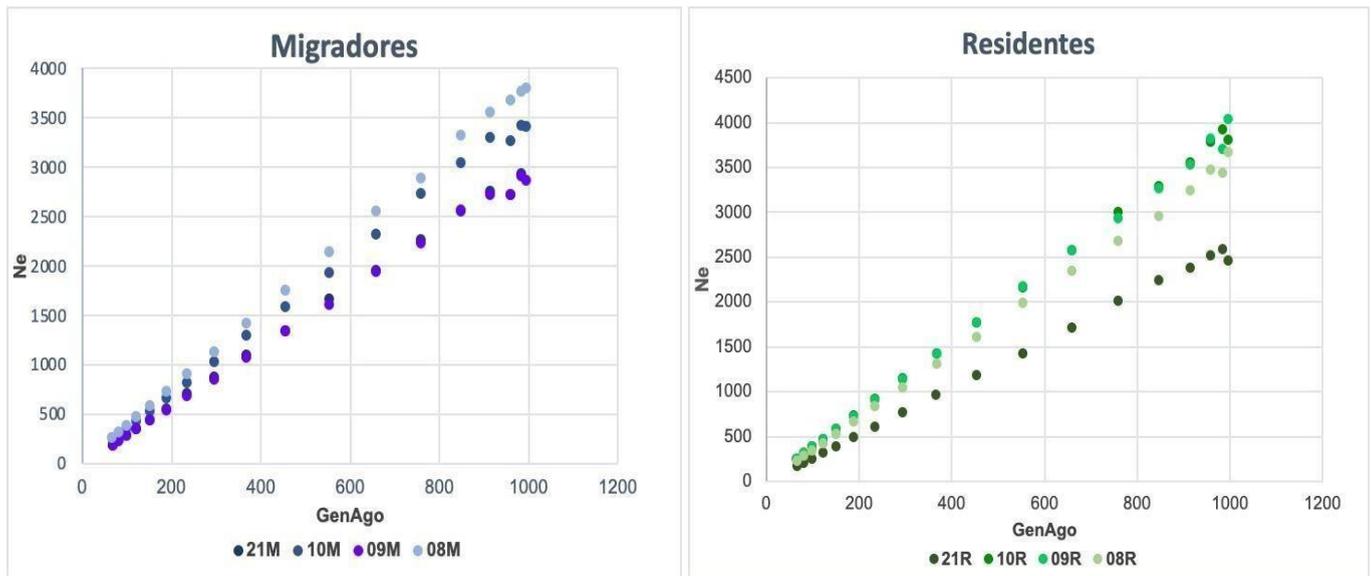
Tabela 2. Número de amostras e análises de diversidade genética de *Prochilodus lineatus* atribuída por ano, através dos dados obtidos pelos SNPs.

Grupos	N	N _F	MAF (DP)	H _O (DP)	H _E (DP)	F _{IS}
08R	10	9	0.241 (0.135)	0.315 (0.183)	0.329 (0.133)	0.08706
08M	10	10	0.240 (0.137)	0.306 (0.180)	0.327 (0.356)	0.13832
09R	10	10	0.241 (0.137)	0.301 (0.176)	0.329 (0.135)	0.11992
09M	10	10	0.427 (0.135)	0.320 (0.189)	0.335 (0.130)	0.11775
10R	10	10	0.239 (0.138)	0.299 (0.176)	0.325 (0.137)	0.12416
10M	10	10	0.243 (0.138)	0.321 (0.188)	0.329 (0.136)	0.05606
21R	10	9	0.243 (0.137)	0.320 (0.202)	0.330 (0.135)	0.10964
21M	10	8	0.243 (0.134)	0.315 (0.186)	0.331 (0.131)	0.07818

N=número de amostras; N_F=número de amostras pós-filtragens; MAF: menor frequência alélica; H_E=heterozigidade esperada; H_O=heterozigidade observada; DP=desvio padrão; F_{IS}=índice de endogamia.

Os gráficos 1 e 2 representam o número efetivo populacional (N_e) dos grupos de migradores e residentes, respectivamente, ao longo das gerações.

Gráfico 1 e 2. Estimativa do número efetivo populacional (N_e) de migradores e residentes ao longo das gerações (GenAgo) com base nos dados obtidos das amostras.



Análises de estrutura populacional

O índice de fixação (F_{ST}) descrito na tabela 3 apresentou valores que variaram no intervalo de -0.0045 a 0.01719. Considerando como significativo os valores com P-value < 0,05, é possível observar um início de estruturação no cardume de migradores de 2008 quando comparado aos cardumes de residentes do mesmo ano, de residentes de 2009 e migradores do mesmo ano, de residentes de 2010 e residentes de 2021, sendo o último estruturado também em comparativo com os residentes de 2008 e de 2009. O cardume de migradores de 2021 também indicou um princípio de estruturação quando comparados aos migradores de 2009 e residentes de 2010.

Tabela 3. Índices de fixação (F_{ST}) calculados em *pairwise* dos diferentes anos de coleta de a partir da análise de SNPs. Destacados em negrito, estão os valores em que $P < 0.05$.

	08R	08M	09R	09M	10R	10M	21R	21M
08R	0.00000							
08M	0.00723	0.00000						
09R	0.00321	0.00929	0.00000					
09M	0.00505	0.00988	0.00078	0.00000				
10R	0.00217	0.00522	0.00298	0.00187	0.00000			
10M	0.00046	0.00470	0.00270	-0.00140	-0.00425	0.00000		
21R	0.01719	0.01666	0.01583	0.00687	0.01104	0.01120	0.00000	
21M	0.00410	0.00516	0.00660	0.00955	0.00625	0.00589	0.01277	0.00000

A análise de variância molecular (AMOVA) foi feita para as 8 populações. Na tabela 4 é observado que a maior porcentagem de variância está entre os indivíduos (88,13%). A variância entre indivíduos dentro das populações foi a segunda mais significativa ao apresentar uma porcentagem de 11,23%. A variação entre populações dentro de grupos foi de 0,49%, enquanto a menor variação foi entre grupos, com um valor de 0,13%.

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de populações de *Prochilodus lineatus*

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	1960.629	0.71433	0.13515
Entre populações dentro de grupos	2511.404	2.62665	0.49697
Entre indivíduos dentro das populações	34334.974	59.38183	11.23514
Entre os indivíduos	31377.500	465.81383	88.13274
Total	70184.507	528.53664	

A distância genética nos componentes C1 e C2 através da análise de escala multidimensional (MDS) aponta que quatro amostras de 2021 se mostraram relativamente distantes geneticamente, enquanto as demais se mostraram muito próximas (figura 5).

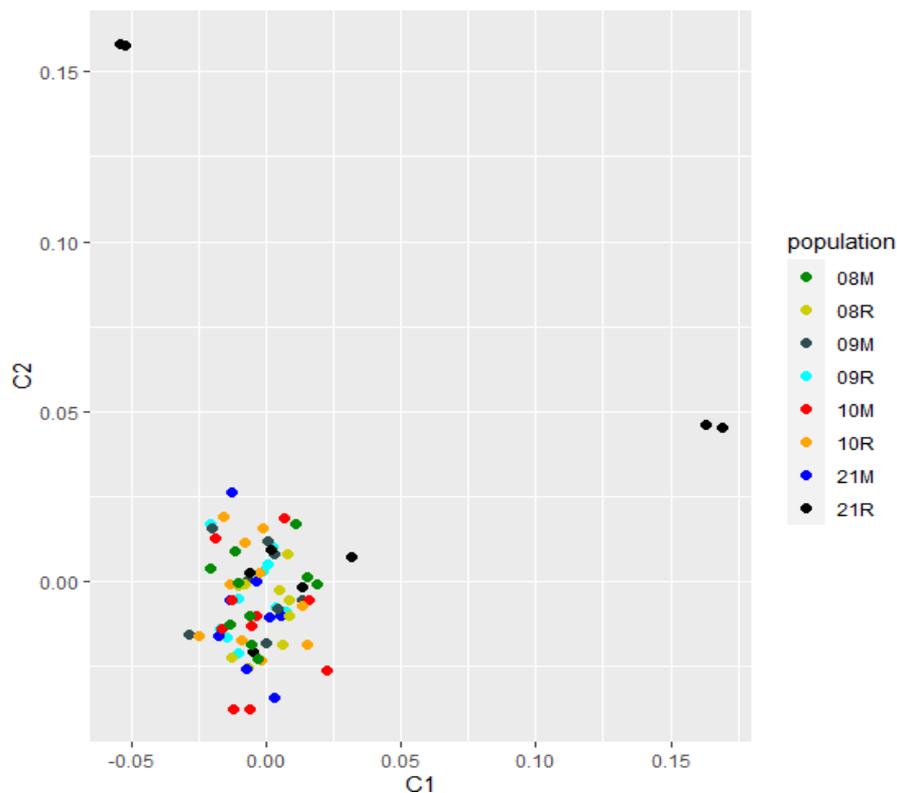


Figura 6. Análise genética populacional de amostras de *Prochilodus lineatus* separadas por cor/ano/grupo. Nessa análise de escala multidimensional (MDS) os indivíduos foram plotados de acordo com suas coordenadas nos dois primeiros componentes (C1 e C2).

Os resultados gráficos gerados pelo software STRUCTURE (figura 7) indicam a presença de clusters diferentes no ano de 2021 no grupo de residentes, e uma distribuição mais homogênea de cluster em todos os anos no grupo de migradores. O valor de K selecionado utilizando o Structure Harvester (<https://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester>) foi 2, tanto para migradores como para residentes.

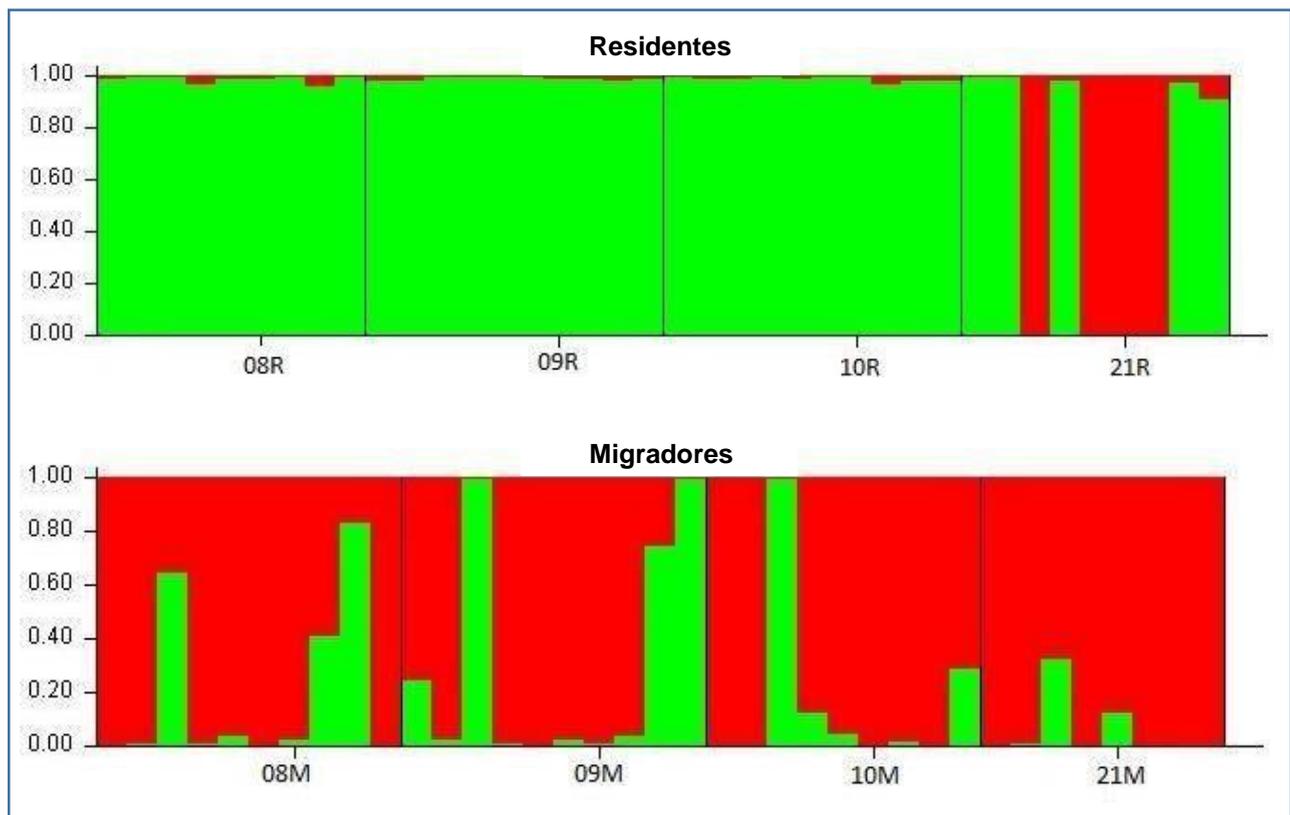


Figura 7. Imagens geradas pelo software Structure, correspondente aos valores de residentes e migradores por ano, respectivamente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Diversidade genética de migradores e residentes

O curimatá, *Prochilodus lineatus* é considerado um modelo de peixe migrador utilizado em diferentes estudos ecológicos, genéticos e populacionais. Assim, compreender os mecanismos e a dinâmica dos cardumes é fundamental para entender a base do processo migratório e como as espécies são capazes de responder às interferências externas e se adaptarem às modificações ambientais (DINGLE, 2006; BOLGER et al., 2008; CHAPMAN et al., 2011). Vários trabalhos ao longo dos anos descreveram características comportamentais, reprodutivas, citogenéticas, presença de cromossomos B de *P. lineatus*, estudos genéticos e populacionais frequentemente utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites, D-loop, entre outros (OLIVEIRA, 2018; PENITENTE, 2018; PORTO-FORESTI, 2018; COSTA, 2021; STORNIOLI, 2021). O desenvolvimento de marcadores como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) passou a ser

considerado importante para análise de questões que vão além da diversidade e fornecem resultados que, outros marcadores, por terem limitações, não são capazes de fornecer, como informações sobre distribuição de espécies panmíticas, controle da sobrepesca e ações antrópicas que incidem sobre os estoques. O desenvolvimento de bibliotecas e a identificação de SNPs para o curimatá é uma atividade pioneira, com potencial para ser aplicada em diversos estudos diante dos desafios das pesquisas voltadas a genética populacional das espécies de peixes Neotropicais, de acordo com o realizado nesse trabalho.

Para peixes migradores, em destaque espécies panmíticas, frequentemente é esperado um alto nível de diversidade genética principalmente devido à ocorrência de elevados índices de fluxo gênico que ocorre nas épocas reprodutivas. Além disso, alguns autores como Penitente (2018) consideram altos índices de variabilidade genética como uma característica já observada para o gênero *Prochilodus*. Como referência desta característica, Garcez et al. (2011) e outros autores relatam em trabalhos populacionais a existência de alta variabilidade genética e ausência de estruturação quando estudados dois ou mais pontos de coleta, em comparações realizadas entre amostras do Rio Grande e do Rio Mogi-Guaçu, sendo que as análises de diversidade genética empregadas apontaram que os valores de heterozigosidade observada (H_o) apresentaram apenas pequenas diferenças quando comparados aos valores da heterozigosidade esperada (H_E).

Em comparações realizadas envolvendo outros trabalhos realizados com peixes do Rio Mogi-Guaçu, como aqueles de Barroca (2012) e Ferreira et al. (2017), os valores de ambas as heterozigosidades (H_o e H_E) desse trabalho se mostram relativamente mais baixas, com valores mais semelhantes àqueles obtidos por Rosa et al. (2022). Contudo, esse fato pode ser justificado pela diferença no tipo de marcador utilizado, sendo que nos trabalhos mencionados foram empregados microssatélites, que tem natureza multi alélica. De forma geral, os valores de heterozigosidade indicam alta diversidade genética.

O índice de endogamia (F_{IS}) revelou a existência de um baixo, mas existente parentesco intrapopulacional, ao se mostrar positivo e significativo. Os valores de H_{WE} mostraram que as populações, de maneira geral, encontram-se em desequilíbrio. Isso pode levar a um excesso de homozigotos, explicando a relativa H_o menor do que a esperada e corroborando o F_{IS} positivo. Os valores de N_e tanto

de migradores como de residentes, indicam uma diferença significativa nos anos de 2008 e 2021 ao longo das gerações, indicando que tende a ocorrer uma diminuição do número efetivo populacional no futuro.

O Rio Mogi-Guaçu, habitat de uma grande população de curimatás, é considerado ameaçado por diversas atividades, como a sobrepesca que incide em trechos do rio, desmatamentos da vegetação marginal ao longo do seu percurso, e com o derramamento de resíduos de cana-de-açúcar devido a acidentes como o ocorrido com rompimento da barragem da Usina Santa Rita em 2013. Mudanças antrópicas ambientais afetam diretamente espécies com comportamento migratório, já que seu processo reprodutivo é dificultado pela fragmentação ambiental (IZZO et al., 2016; ROSA et al., 2022). Variados estudos já relataram que a modificação de habitats por ações antrópicas pode impactar até mesmo peixes migradores continentais que, por natureza, apresentam alto fluxo gênico, levando-os à estruturação (MELDGAARD et al., 2007; PEREIRA et al., 2016, ROSA et al., 2022). Considera-se, pois, que o monitoramento da ictiofauna do Rio Mogi-Guaçu através de estudos de diversidade genética de espécies promissoras como as migradoras é necessário para a manutenção ecossistêmica. Assim, conhecer a biologia e o comportamento das espécies contribui para isso, gerando informações necessárias para controle e fiscalização das populações.

Estrutura genética de migradores e residentes

Na análise de estruturação genética pode-se identificar a distância genética com base em dados interpopulacionais por períodos anuais. A imagem gerada pelo MDS (figura 5) revela 4 curimatás residentes do ano de 2021 como relativamente distantes geneticamente em comparação aos demais peixes em análise. Em contrapartida, o restante dos indivíduos mostrou grande proximidade genética. Já a análise de variância molecular (AMOVA) resultou em maior variação entre indivíduos (88,13%) e uma representativa variação entre indivíduos dentro das populações (11,23), o que é corroborado com os resultados gerados pelo Structure, que destaca alguns indivíduos estruturados ao longo dos anos. Em seguida, as variações entre populações e entre grupos foi pouco significativa, sendo de 0,49 e 0,13% respectivamente.

O índice de fixação (F_{ST}) indicou um nível de estruturação entre alguns grupos, quando considerados $P < 0.05$. Através dos dados obtidos, é possível concluir a maior diferenciação é encontrada entre migradores e residentes. Todos os anos e grupos apresentaram um nível de estruturação. Entretanto, a maior diferenciação está entre os grupos de 2008 (tanto migradores como residentes) e os residentes de 2021. Como observado, a diferenciação entre os grupos é observada apenas para alguns indivíduos, mas os dados trazem confiabilidade pelo número de marcadores empregados.

Em seu trabalho, Oliveira (2018) relatou a existência de uma significativa diferença genética nas amostras de *P. lineatus* coletadas no Rio Mogi-Guaçu nos anos de 2005 e 2009 e entre os anos de 2009, 2010 e 2015 com relação aos valores de F_{ST} ao usar o marcador D-loop. Já com as análises utilizando marcadores microssatélites, a maior parte das amostras apresentou diferenças moderadas na estruturação ao longo dos anos. Com a aplicação do AMOVA foi detectada estruturação baixa em relação ao D-loop e moderada em relação aos microssatélites. Os dados obtidos com os SNPs corroboram a existência de uma tênue estruturação nos anos amostrados, principalmente no que se refere ao último ano de coleta (2021). Os valores de K mostram que dentre os residentes existe o agrupamento de alguns indivíduos quando comparados os períodos de 2008 e 2021. Entre os migradores foi possível identificar uma distribuição maior de todos os *plots*, o que indicaria a menor possibilidade de estruturação, já que todos os *clusters* estão presentes em todas as amostras.

Em condições normais, para espécies panmíticas, Machado e Foresti (2012) afirmam que as diferenças genéticas entre cardumes não teriam magnitude suficiente para torna-las subpopulações que sofreram estruturação. Assim, uma das hipóteses defendidas pelos autores é que apesar da existência de populações residentes e diminuição da população de migradores, a recuperação e manutenção da biodiversidade da espécie se deve ao grande tamanho efetivo populacional (que aumenta a taxa de recombinação alélica) e à sua alta variabilidade genética (AGOSTINHO et al., 2003; FERREIRA et al., 2015), o que acaba favorecendo o reestabelecimento e estabilidade do estoque ao longo dos anos e minimizando a perda da diversidade genética por deriva genética (SANTOS et al., 2007; ROSA et al., 2022).

O cruzamento entre migradores e residentes durante o período reprodutivo pode restabelecer o fluxo gênico, mantendo a diversidade genética da população. Entretanto, o início de variáveis populacionais como surgimento do excesso de homozigotos, índice positivo de endogamia e redução do N_e ao longo das gerações podem indicar um princípio de estruturação que se desdobrará nas próximas décadas. Autores como Rueda et al. (2013) já identificava estrutura em *Prochilodus lineatus* na parte baixa do rio Uruguai em cardumes coletados em diferentes períodos. Perini et al. (2021), por sua vez, encontrou diferenciação em indivíduos da espécie coletados em diferentes pontos do rio Mogi-Guaçu, Pardo e Grande, corroborando o fato de que mesmo espécies panmíticas podem sofrer queda de diversidade genética.

Apesar de os fatores evolutivos serem detectados apenas ao longo de muitos anos, após 13 anos de amostragem entre 2008 e 2021 já foi possível observar divergências que devem ser consideradas. Ademais, vale ressaltar que os grupos de peixes representam populações que compõe um ecossistema, o qual sofrem alterações e influências de fatores bióticos e abióticos, que podem variar conforme o período e ano amostrado e interferir na dinâmica dos cardumes que, por sua vez, não estão imunes aos processos evolutivos e às interferências antrópicas que aumentam a cada ano.

Este é um estudo com dados relevantes para o conhecimento e conservação da espécie, além de trazer uma análise pioneira em cardumes de *Prochilodus lineatus* ao empregar o uso de marcadores moleculares do tipo SNPs, considerando que os estudos encontrados atualmente para a espécie são realizados principalmente com marcadores microssatélites. Assim, este trabalho, além de fornecer informações relevantes para a biologia e conservação dos curimatás na região do rio Mogi-Guaçu, tem grande potencial para ser aplicado e utilizado como alicerce em estudos futuros com o uso de SNPs, contribuindo em conhecimentos diversos acerca da espécie.

Pode-se inferir que a descrição e aplicação dos marcadores genéticos SNPs como ferramenta foi adequadamente empregada e eficiente para compor o pool de amostras analisadas e gerar resultados que enriqueceram discussões a respeito da panmicidade e variabilidade genética da espécie. Além disso, a amostragem temporal foi capaz de identificar divergências importantes que ocorreram ao longo

dos 13 anos estudados, uma vez que os dados estatísticos e genéticos apontaram diferenças significativas entre 2008 e 2021.

Distinguir a amostragem de residentes e migradores foi essencial para concluir que a maior diferenciação vem ocorrendo entre os residentes, enquanto cardumes de migradores apresentaram maior distribuição de seus alelos em todos os anos. Assim, apesar de a diversidade genética ainda ser considerável, as análises empregadas, como N_e , comprovaram que os cardumes estão apresentando um princípio de estruturação genética, que pode ser refletida nos próximos anos ao longo de futuras gerações. Dessa forma, a técnica e a metodologia empregadas foram capazes de sanar as hipóteses propostas e gerar dados enriquecedores acerca da espécie *P. lineatus* habitantes do rio Mogi-Guaçu e sua conservação.

5 REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. et al. Migratory fishes of the upper Paraná River basin, Brazil. In: GOMES L. C. et al. Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. Ottawa:World Fisheries Trust: The World Bank: International Development Research Centre; 2003. p.19–98. 2003.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. Estocagem. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 253–274, 2007.
- ALLEDORF, F. W.; HOHENLOHE P.A.; LUIKART, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 697– 709, 2010.
- ALVIM, M. C. C.; PERET, A. C. Recursos alimentares que sustentam a ictiofauna em um trecho do alto rio São Francisco, município de Três Marias, MG, Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 195-202, 2004.
- ANDERSON, E. P. et al. Fragmentation of Andes-to-Amazon connectivity by hydropower dams. **Science Advances**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2018.
- ANDREWS, K. R., et al. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 17(2), p. 81–92, 2016.
- ANDREWS, C. et al. A marker of biological ageing predicts adult risk preference in European starlings, *Sturnus vulgaris*. **Behavioral Ecology**, v. 29, n. 3, p. 589-597, 2018.
- ANDREWS, S. et al. Priming of MSCs with inflammation-relevant signals affects extracellular vesicle biogenesis, surface markers, and modulation of T cell

- subsets. **Journal of Immunology and Regenerative Medicine**, v. 13, p. 100036, 2021.
- BARRELA, W. Indicadores ambientais: conceitos e aplicações. **São Paulo: EDUC/COMPED/INEP**, 2001.
- BARNOSKY, A. D. et al. Has the Earth' s sixth mass extinction already arrived? **Nature**, p. 1–7, 2011.
- BAYLEY, P. B. Studies on the migratory characin, *Prochilodus platensis* Holmberg 1889, (Pisces, Characoidei) in the river Pilcomayo, South America. **Journal of Fish Biology**, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1973.
- BAUER, S.; HOYE, B. J. Migratory animals couple biodiversity and ecosystem functioning worldwide. **Science**, v. 344, n. 6179, p. 1242552, 2014.
- BOWEN, S. H. The river flood pulse, benthic biofilm, and the nutrition of **Prochilodus lineatus**. **Environmental Biology of Fishes**, p. 1-18, 2022.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. Catálogo dos peixes marinhos e de água doce do Brasil. URL: <http://www.mnrj.ufrj.br/catalogo>, 2003.
- BOLGER, D. T.; NEWMARK, W. D.; MORRISON, T. A.; DOAK, D. F. (2008) The need for integrative approaches to understand and conserve migratory ungulates. **Ecology letters**, v. 11.1., p. 63-77, 2008.
- CARVALHO, F. R.; LANGEANI, F. *Hyphessobrycon uaiso*: new characid fish from the rio Grande, upper Rio Paraná basin, Minas Gerais State (Ostariophysi: Characidae), with a brief comment about some types of Hyphessobrycon. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, p. 525-536, 2013.

- COSTA, G. O. Aprimoramento do protocolo de DNA metabarcoding para aplicação na identificação de áreas prioritárias à conservação da ictiofauna do rio Mogi-Guaçu. Dissertação - Ciências Biológicas, IBB. 2021.
- CELESTINO, L. F. et al. Migração de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) através de escada para peixes em usina hidrelétrica: gatilhos migratórios e conectividade bidirecional. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2018.
- DINGLE, H. Animal migration: is there a common migratory syndrome? **Journal of Ornithology**, v. 147, n. 2, p. 212-220, 2006.
- DINGLE, H. Migration: the biology of life on the move. **Oxford University Press**, USA, 2014.
- DE SANTANA, H. S.; MINTE-VERA, C. V. Age and growth of *Prochilodus lineatus* in a spatially structured population: is there concordance between otoliths and scales? **Environmental Biology of Fishes**, v. 100, n. 3, p. 223-235, 2017.
- DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews**. n. 2006, p. 163–182, 2015.
- ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; ELER, M. N. Avaliação das modificações na qualidade da água do Rio Mogi-Guaçu: uma análise temporal. **Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**, p. 189-204, 2003.
- FERREIRA, D.G. et al. Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. *Conserv Genet*. 16:151–66. 2015.
- FROESE, R.; PAULY, D. Fishbase. World Wide Web electronic publication. Retrieved 06/2015, 2015, from www.fishbase.org. 2015.

- FLECKER, A. S. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. **Ecology**, v. 77, n. 6, p. 1845-1854, 1996.
- GARCEZ, R.; CALCAGNOTTO, D.; DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 21, n. 3, p. 268-275, 2011.
- GARCIA-MORENO, J. et al. Sustaining freshwater biodiversity in the Anthropocene. **The global water system in the Anthropocene**. Springer, Cham, p. 247-270. 2014.
- GOUDIE, A. S. Human impact on the natural environment. John Wiley & Sons, 2018.
- GORDON, T. A. C. et al. Fishes in a changing world: learning from the past to promote sustainability of fish populations. **Journal of fish biology**, v. 92, n. 3, p. 804-827, 2018.
- GODINHO, A. L.; KYNARD, B. Migratory fishes of Brazil: life history and fish passage needs. **River Research and Applications**, v. 25, n. 6, p. 702-712, 2009.
- GOMES, L. C.; MIRANDA, L. E. Riverine characteristics dictate composition of fish assemblages and limit fisheries in reservoirs of the Upper Paraná River Basin. **Regulated Rivers: Research & Management: An International Journal Devoted to River Research and Management**. v. 17, p. 67-76, 2001.
- HOEINGHAUS, David J. et al. Effects of river impoundment on ecosystem services of large tropical rivers: embodied energy and market value of artisanal fisheries. **Conservation Biology**, v. 23, n. 5, p. 1222-1231, 2009.
- HELFMAN, G. et al. The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology. John Wiley & Sons, 2009.

- IZZO, C. et al. Fish as proxies of ecological and environmental change. **Rev Fish Biol Fish**. 26:265–86. 2016.
- KNOUFT, J. H.; FICKLIN, D. L. The potential impacts of climate change on biodiversity in flowing freshwater systems. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 48.1. 2017.
- LOWE-McCONNELL, R. H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Translation of A. E. A. M. Vazzoler, A. A. Agostinho & P. Cunnighan, São Paulo. Ed. da Universidade de São Paulo. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**, 535p. 1999.
- LANGANI, F. et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 181-197, 2007.
- LAVOUÉ, S. et al. Trophic evolution in African citharinoid fishes (Teleostei: Characiformes) and the origin of intraordinal pterygophagy. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 113, p. 23-32, 2017.
- LOBATO, T. C.; et al. Construction of a novel water quality index and quality indicator for reservoir water quality evaluation: A case study in the Amazon region. **Journal of Hydrology**, v. 522, p. 674–683, 2015.
- LOPES, C. A. e ZANIBONI-FILHO, E. Mosaic environments shape the distribution of Neotropical freshwater ichthyoplankton. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 28, n. 4, p. 544–553, 2019.
- LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Genetic diversity of pacu and piapara broodstocks in restocking programs in the rivers Paraná and Paranapanema (Brazil). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 2365-2373, 2016.

- LEMOPOULOS, A. et al. Comparison of migratory and resident populations of brown trout reveals candidate genes for migration tendency. **Genome Biology and Evolution**, v. 10, n. 6, p. 1493-1503, 2018.
- MAIA, E. L. et al. Composição química e classes de lipídios em peixe de água doce curimatã comum, *Prochilodus cearensis*. **Food Science and Technology**, v. 19, p. 433-437, 1999.
- MILLS, E. L. et al. Colonization, ecology, and population structure of the " quagga" mussel (Bivalva: Dreissenidae) in the lower Great Lakes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 50, n. 11, p. 2305-2314, 1993.
- MAKRAKIS, M. C. et al. Diversity in migratory patterns among Neotropical fishes in a highly Regulated River basin. **Journal of Fish Biology**, 81, 866–881, 2012.
- MACHADO, M. Características morfométricas e corporais de curimatã *Prochilodus lineatus* (Characiforme: Prochilodontidae) dos estoques migradores e residentes do rio Mogi-Guaçu. 2007.
- MACHADO, M. R. F.; FORESTI, F. Morphometric characteristics of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1847), of the migratory and resident stocks of the river Mogi-Guaçu, São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 34, p. 341-346, 2012.
- MELDGAARD, T. et al. Hybridization mechanisms between the endangered marble trout (*Salmo marmoratus*) and the brown trout (*Salmo trutta*) as revealed by in-stream experiments. **Biol Conserv.** 136(4):602–11. 2007.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. Fishes of the world. 5rd ed. John Wiley and Sons, New York. 707pp. 2016.

- NORTHCOTE, T. G.; WALTERS, C. J.; HUME, J. M. B. Initial impacts of experimental fish introductions on the macrozooplankton of small oligotrophic lakes: With 4 figures in the text. **Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen**, v. 20, n. 3, p. 2003-2012, 1978.
- OLIVEIRA, D. J. identificação de populações e de padrões de migração de *Prochilodus lineatus* no ecossistema dos rios Mogi-Guaçu, Pardo e Grande com o uso de marcadores genéticos moleculares. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, UNESP. 2018.
- PELICICE, F. M. et al. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 6, p. 1119–1133, 2017.
- PEREIRA, L. S. et al. Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. **Ecotoxicol Environ Saf.** 130:29–36. 2016.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.
- REIS, R. E. et al. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.
- ROSA, I. F. et al. Temporal genetic structure of a stock of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) in the Mogi-Guaçu River ecosystem, São Paulo, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, 2022.
- ROSSINI, B. Caracterização da estrutura genética de populações residentes e migradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da Bacia do rio Mogi-Guaçu”. 2010.
- RUEDA, E.C. et al. Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. **Rev Bras Genet.** 141:401–07. 2013.

- SANCHES, P. V. et al. Flow regulation by Dams affecting ichthyoplankton: The case of the Porto Primavera Dam, Paraná River, Brazil. **River Research and Applications**, v. 22, n. 5, p. 555–565, 2006.
- SANTANA, H. S.; MINTE-VER, C. V. Age and growth of *Prochilodus lineatus* in a spatially structured population: is there concordance between otoliths and scales? **Environmental Biology of Fishes**, 100: 223–235. 2017.
- SANTOS, M. C. F. et al. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **J Fish Biol.** 71:33–44. 2007.
- SILVA, J. C. et al. Importance of dam-free stretches for fish reproduction: the last remnant in the Upper Paraná River o último remanescente do alto Rio Paraná. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 29, 2017.
- SHAW, T. J.; MARTIN, P. Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration. **Current opinion in cell biology**, v. 42, p. 29-37, 2016.
- STORNIOLI, J. H. F. Caracterização do satelitoma de *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes) e a diferenciação de cromossomos B. 2021.
- WENDT, E. W. et al. Phylogenetic relationships and historical biogeography of *Oligosarcus* (Teleostei: Characidae): Examining riverine landscape evolution in southeastern South America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 140, p. 106604, 2019.
- WORLD BANK GROUP. World development report 2016: Digital dividends. **World Bank Publications**, 2016.

MATERIAIS COMPLEMENTARES

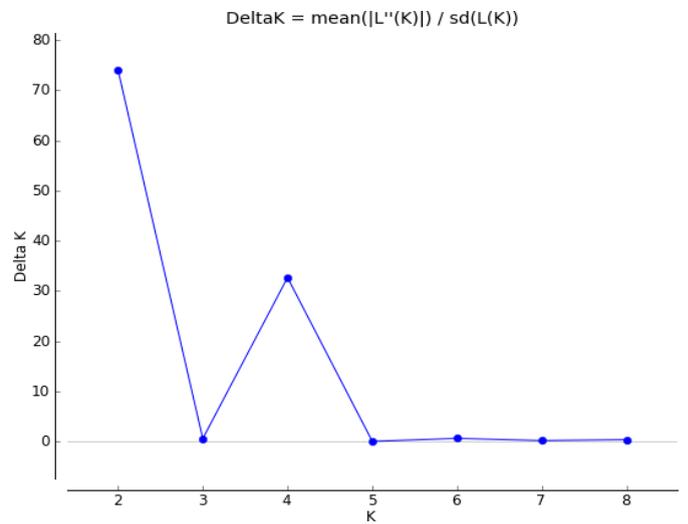
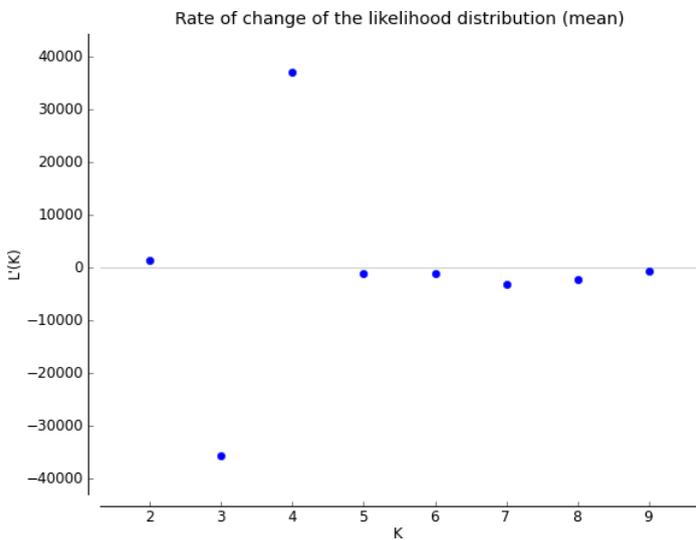
1. Número de sequências brutas por amostra obtidas após o sequenciamento.

Amostras	Nº de sequências
001_09R	574.972
002_09R	458.758
003_09R	535.217
004_08R	473.873
005_09R	416.544
006_09R	446.804
007_08R	691.175
007_09R	360.99
008_08R	753.659
009_09R	738.677
010_09R	797.423
011_09R	505.494
012_09R	304.697
076_21M	526.334
100_09M	465.514
102_09M	522.171
105_09M	597.927
107_09M	561.985
108_09M	345.868
113_09M	387.771
116_09M	422.509
120_09M	231.468
145_10M	575.454
146_10M	471.674
157_10M	676.066
165_10M	660.315
167_21M	611.512
177_10M	459.01
179_21M	415.233
180_10M	507.195
180_21M	459.146
18_08R	780.788
186_10M	333.926
187_21M	545.379
193_21M	325.914
206_21M	296.063

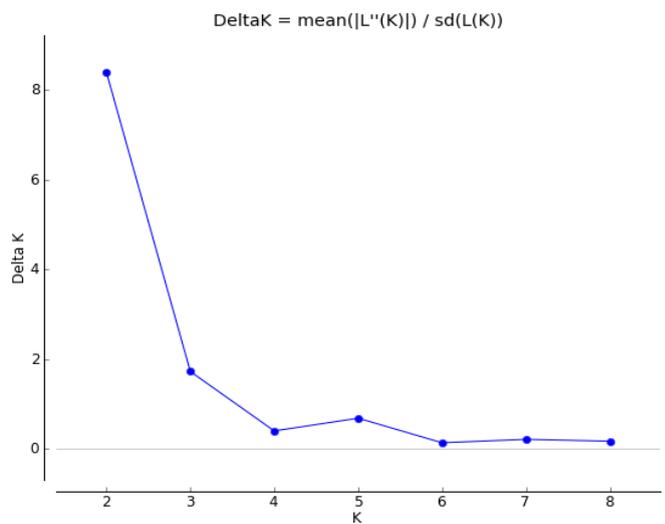
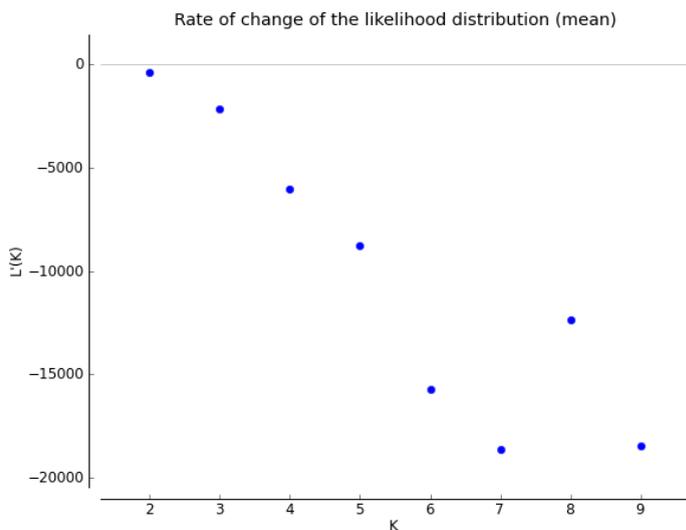
212_21M	360.668
225_21M	59.56
239_21M	28.693
248_10M	626.894
266_10M	819.143
27_08R	23.379
278_10M	605.794
28_08R	573.561
3295_10R	500.311
3306_10R	512.357
3331_10R	676.753
3337_10R	501.096
3359_10R	706.755
3377_10R	965.228
3398_10R	634.631
34_08R	562.359
3443_10R	568.024
3478_10R	515.293
3550_10R	576.344
40_08R	543.795
401_21R	353.707
402_21R	424.745
403_21R	378.261
404_21R	553.49
406_21R	331.6
407_21R	240.766
408_21R	515.321
409_21R	462.402
410_21R	562.954
411_21R	347.031
46_08R	787.882
47_08R	615.042
49_08M	791.331
51_08M	749.039
54_08M	609.931
58_08M	603.669
62_08M	741.083
66_08M	567.371
67_08M	801.328
68_08M	451.08
69_08M	751.433
70_08M	624.432
97_09M	804.851

98_09M	555.224
Total	40.006.386

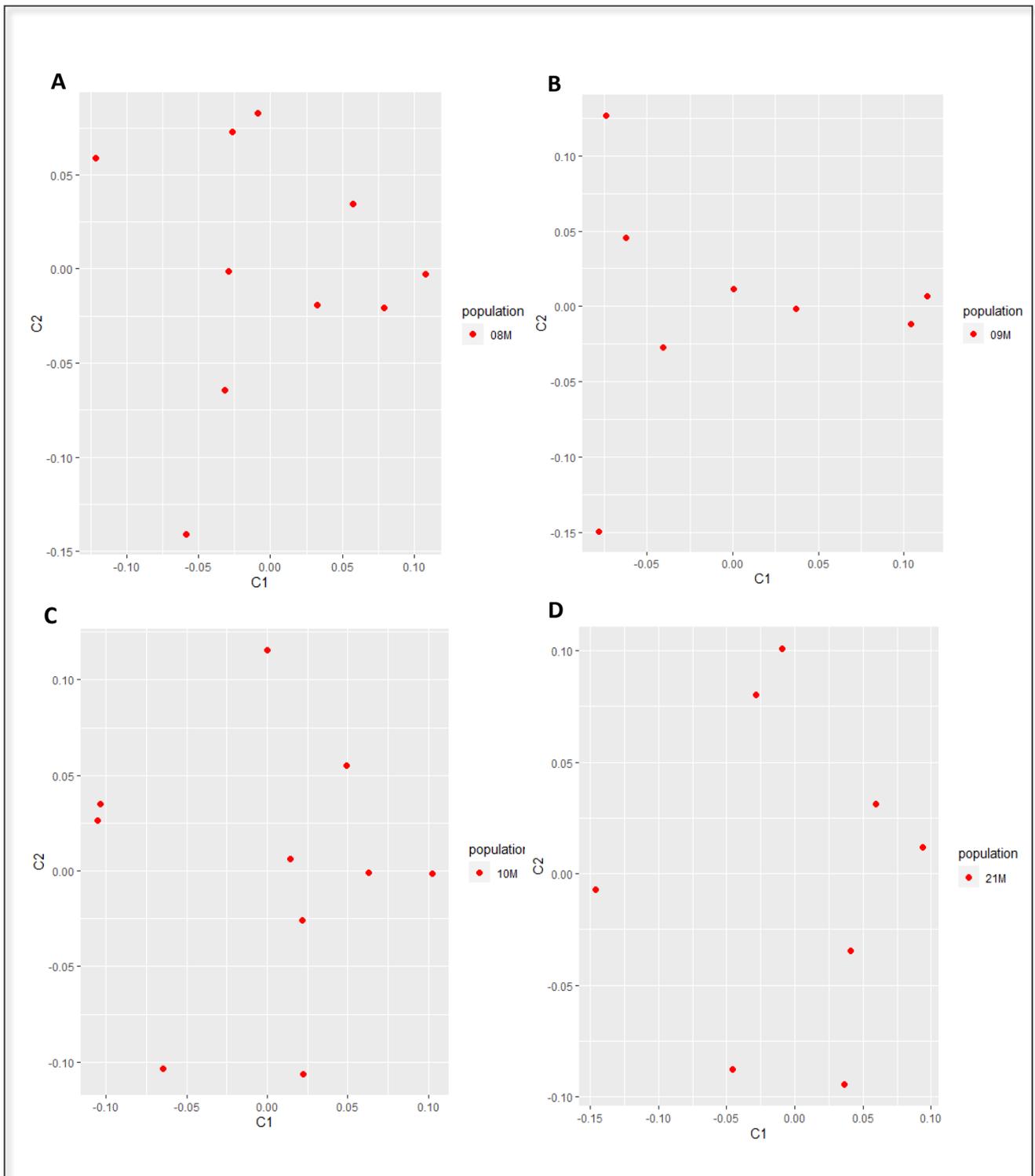
2. Gráficos gerados pelo Evanno Method e Delta K, respectivamente, para análise do grupo de residentes.



3. Gráficos gerados pelo Evanno Method e Delta K, respectivamente, para análise do grupo de migradores.



4. MDS por grupos de migradores, sendo A o grupo de 2007, B o de 2009, C o grupo de 2010 e D o de 2021.



5. MDS por grupos de residentes, sendo A o grupo de 2007, B o de 2009, C o grupo de 2010 e D o de 2021.

