

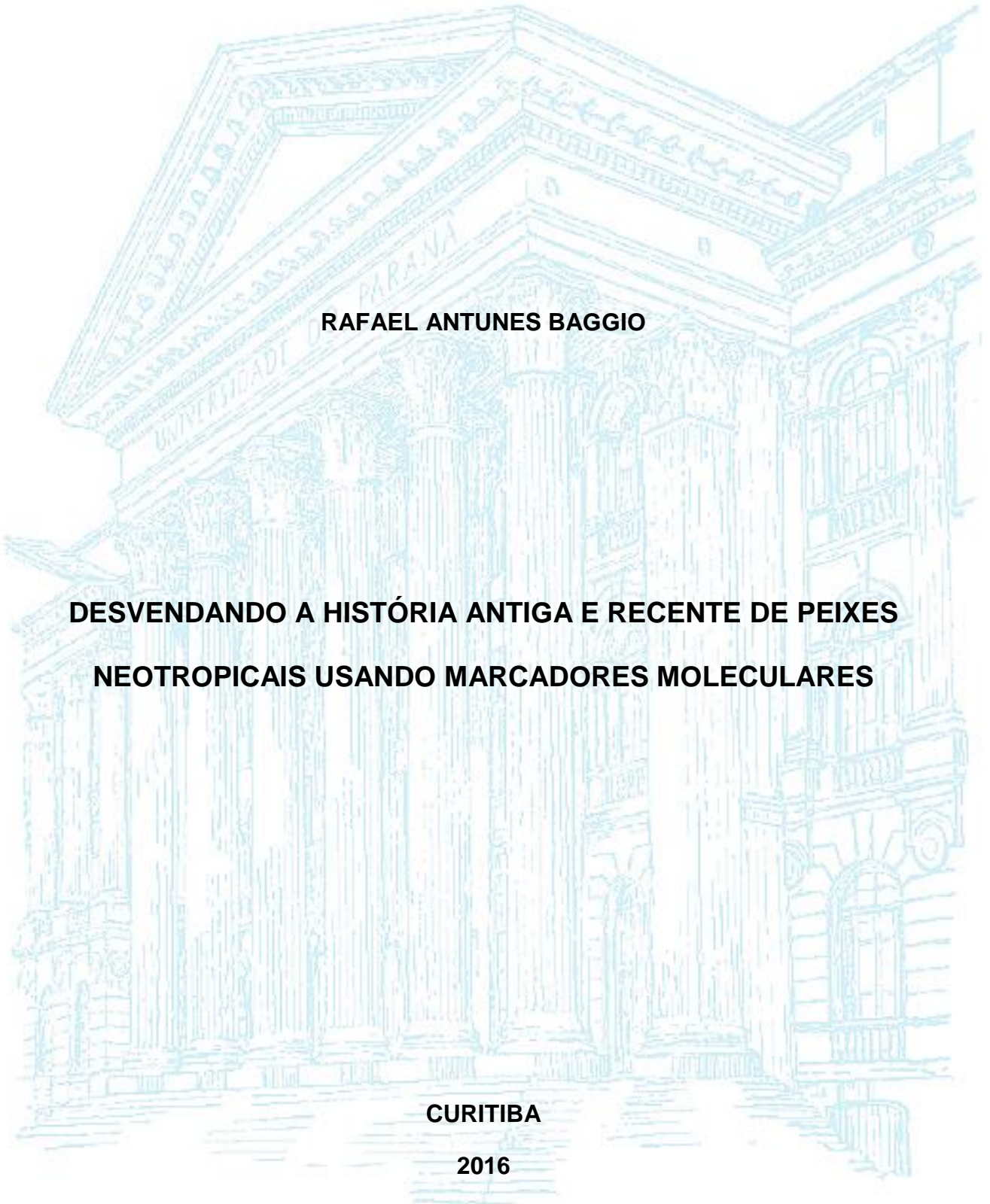
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL ANTUNES BAGGIO

**DESVENDANDO A HISTÓRIA ANTIGA E RECENTE DE PEIXES
NEOTROPICAIS USANDO MARCADORES MOLECULARES**

CURITIBA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL ANTUNES BAGGIO

**DESVENDANDO A HISTÓRIA ANTIGA E RECENTE DE PEIXES NEOTROPICAIS
USANDO MARCADORES MOLECULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ecologia e Conservação.

Orientador: Walter A. Boeger

CURITIBA

2016




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO
Código CAPES: 40001016048P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **RAFAEL ANTUNES BAGGIO**, intitulada: **""Desvendando a história antiga e recente de peixes neotropicais usando marcadores moleculares""**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua


Curitiba, 03 de Março de 2016.

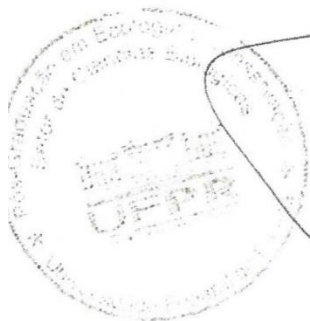

Prof WALTER ANTONIO PEREIRA BOEGER (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)


Prof CLAUDIO DE OLIVEIRA (UNESP)


Prof LUIZ ROBERTO MALABARBA (UFRGS)


Prof MAURICIO OSVALDO MOURA (UFPR)


Prof VINÍCIUS ABILHÔA (UFPR)



Programa de Pós Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO | UFPR
Centro Politécnico - Setor de Ciências Biológicas - Curitiba - Paraná - Brasil"
CEP 81531980 - Tel: (41) 33611595 - Fax: (41) 3266-2042 - E-mail: ecologia@ufpr.br

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao professor Walter Boeger pela orientação, confiança e incentivo ao longo dos últimos 10 anos de trabalho, essenciais para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Henry Spach e ao Sérgio Stoiev, pelas importantes contribuições nas coletas e processamento das amostras de peixe-rei, que permitiu o desenvolvimento e testes das hipóteses relacionados ao padrão de diversificação de *Atherinella brasiliensis*.

À professora Andréa Bialezki, pelas inestimáveis contribuições para o desenvolvimento da tese, realização das coletas e identificação morfológica das larvas de *Pseudoplatystoma corruscans*.

À Professora Sabrina de Araújo, pela essencial contribuição no desenvolvimento conceitual e prático do modelo matemático criado nessa tese, assim como no auxílio para as simulações.

À banca, professores Claudio de Oliveira (UNESP), Luiz Roberto Malabarba (UFRGS), Maurício Osvaldo Moura (UFPR) e Vinícius Abilhôa pelas importantes considerações e contribuições, e aos suplentes Guilherme Schnell e Schuhli (EMBRAPA) e Paulo de Tarso (UFPR) pela disponibilidade.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE), pela amizade, companheirismo, convivência e trocas de experiências e conhecimento. Especialmente ao amigo Marcel Tschá, pelas discussões diárias, acadêmicas ou não. À Raquel Patella e à Caroline Moretti pela ajuda no processamento das amostras. Agradeço, ainda, ao Flávio Marteleto, Emanuel Razzolini, Letícia Larcher, Luciana Patella, Daiane Pilatti, Taísa Marques, Alini Vieira, Caroline Sereneski, Maria Pil, Raphael Ribeiro, Mariana Braga e José Francisco.

Aos colegas da University of New Mexico, especialmente ao professor Thomas Turner pela receptividade e pelas discussões a respeito da minha tese, e à PhD. Megan Osborne pela ajuda nos processamentos do marcador SSCP. Agradeço também a Evan Carson, Mike Schwemm, Nike Smith, Tyler Pilger, Adam Barkalow, Alyssa Sanchez, Marisa Esquivel e Jerel Garcia pela receptividade e ajuda no período em que fiquei em Albuquerque - EUA.

À minha amada esposa Débora Rebechi, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão ao longo desses 8 anos juntos e 3 de casados.

Aos meus pais Olindo Baggio e Tânia Baggio pelo carinho, educação e exemplos na construção do que sou hoje.

Aos meus amigos, pela importante parceria e companheirismo ao longo dos anos, especialmente ao Flávio Tincani, Israel Endrio Oliveira, Amanda Scorzato, Bruna Vitti, Marcelo Borges.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação pelo apoio ao projeto. À CAPES, CNPq e MPA pelo auxílio financeiro no desenvolvimento da tese. Ao Parque Nacional de Ilha Grande, ao Nupélia e aos pescadores Antonio Silva e Emerson Rosa pelo auxílio na realização das coletas.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
SUMÁRIO	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências Bibliográficas	4
OBJETIVO GERAL	7
CAPÍTULO I	8
OPPORTUNITY AND TAXON PULSE: HOW COASTAL GEOMORPHOLOGY MAY INFLUENCE THE GENETIC DIVERSIFICATION AND ENDEMISM OF ESTUARINE SPECIES	9
Abstract.....	10
Introduction	11
Material and Methods	13
Results	17
Discussion	21
References	28
CAPÍTULO II	34
AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE <i>HOMING</i> DE GRANDES BAGRES DO ALTO PARANÁ: UMA NOVA ABORDAGEM	35
Resumo	36
Introdução.....	37
Materiais e Métodos	39
Resultados.....	44
Discussão	49
Referências Bibliográficas	54
CAPÍTULO III	62
HYBRIDS BETWEEN <i>PSEUDOPLATYSTOMA CORRUSCANS</i> AND <i>P. RETICULATUM</i> (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) PREVIOUSLY REPORTED IN THE UPPER PARANÁ RIVER ARE LIKELY ESCAPES FROM AQUACULTURE FARMS: EVIDENCE FROM MICROSATELLITE MARKERS	63
Literature cited	73

CAPÍTULO IV	78
AVALIANDO O IMPACTO DE BARRAGENS SOBRE A GENÉTICA DE PEIXES QUE REALIZAM <i>HOMING</i> COM MODELO BASEADO EM INDIVÍDUOS.....	79
Resumo	80
Introdução.....	81
Materiais e Métodos	83
Resultados.....	91
Discussão	102
Referências Bibliográficas	108
CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
Referências Bibliográficas	118

RESUMO

Padrões de diversificação e estrutura genética das espécies são resultados da interação de características biológicas (capacidade) e ambientais (oportunidade). Essas características interagem ao longo do tempo, de forma que o mosaico de padrões presentes na natureza é resultado tanto de eventos contemporâneos quanto de eventos históricos. Esse trabalho tem como objetivo avaliar, através de marcadores moleculares, como as características biológicas e ambientais (capacidade e oportunidade) se relacionam ao longo de diferentes escalas de tempo para formar os padrões de estrutura genética e diversificação de espécies de peixes neotropicais. Para isso, dois modelos são utilizados. No primeiro modelo (**Capítulo I**), os padrões de diversificação e estrutura genética de *Atherinella brasiliensis* (avaliados através dos fragmentos mitocondriais D-loop e Citocromo Oxidase B) suportaram que as características biológicas (espécie estuarina com retenção larval e dispersão limitada) possibilitaram o isolamento e a diversificação alopátrica durante períodos de alta do nível do mar e conexão durante eventos de regressão nas populações do Sul do Brasil, propiciando diversificação por *Taxon Pulse*. Na região sul do país, a plataforma continental é profunda e extensa, e conexões entre bacias e estuários com fluxo gênico entre as populações durante eventos de baixa do nível do mar são prováveis. Alternativamente, as populações do nordeste do Brasil (plataforma continental rasa e estreita) se mantiveram isoladas mesmo durante períodos de baixa do nível do mar, apresentando profunda diferenciação genética e endemismo de linhagens entre as populações. Assim, os resultados suportam a influência do tamanho da plataforma continental nos padrões de estrutura genética e diversificação de *A. brasiliensis*. No segundo modelo, foi testada a presença de comportamento de *homing* no pintado *Pseudoplatystoma corruscans* no Alto Rio Paraná através de marcadores microssatélites e sequências mitocondriais (**Capítulo II**). As diferenças entre as populações de larvas (identificação das larvas realizada no **Capítulo III**) do Rio Amambaí com aquelas dos Rios Ivinheima e Ivaí (áreas de reprodução) e mistura das populações nas áreas de alimentação (regiões baixas dos tributários e calha principal do Rio Paraná) sugerem que *P. corruscans* realiza *homing*. Contudo, a ausência de diferenciação genética entre as populações dos Rios Ivinheima e Ivaí pode ser decorrente do impacto da barragem de Porto Primavera, à montante da região analisada. Essa hipótese foi testada através de um modelo matemático criado no **Capítulo IV**. As simulações suportam que a adição de uma barragem gera homogeneização genética entre populações que realizam *homing*, especialmente naquelas adjacentes à barragem. Assim, os resultados dos **Capítulos II e IV** suportam a hipótese que *P. corruscans* da bacia do Alto Rio Paraná realiza *homing*, mas que a UHE de

Porto Primavera provavelmente causou homogeneização genética entre as populações dos Rios Ivaí e Ivinheima. Por fim, os resultados da tese exemplificam como as capacidades das espécies (e.g. retenção larval; migrações e *homing*) interagem com as diferentes oportunidades (e.g. ciclos de isolamento e reconexão entre bacias litorâneas e estuários devido a movimentos eustáticos; sistema dendrítico com heterogeneidade ambiental), atuando interativamente na determinando os padrões de diversificação e estrutura genética das espécies. Essa abordagem é essencial para o entendimento dos mecanismos que geram a biodiversidade atual e possibilitam o embasamento de estratégias de manutenção dos potenciais evolutivos de espécies de peixes neotropicais.

Palavras-chaves: *Atherinella brasiliensis*, Barragens, Genética da Conservação, Híbridos, *Homing*, Larvas de peixes, Modelos matemáticos, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Taxon Pulse*.

ABSTRACT

Diversification patterns and genetic structure of fish species result from biological (capacities) and environmental (opportunity) characteristics. These characteristics interact over time, and the mosaic of biological patterns is resulted from historical and current events. The main goal of the present study is assess how biological and environmental characteristics (capacity and opportunity) interact over different temporal scales to create the diversification patterns and genetic structure of Neotropical fish species. First, the diversification pattern and the genetic structure of the estuarine silverside *Atherinella brasiliensis* support biological characteristics (limited gene flow among populations) allow isolation and allopatric diversification in periods of high sea level, and connections among populations in periods of low sea level in South Brazil. Therefore, these cycles of isolation and expansion along the eustatic sea level changes permit these populations to diversify by Taxon Pulse. In the South Brazil, the continental shelf is broader, and its basins present great connections during periods of low sea level. Alternatively, the estuaries and basins from northeastern Brazil (narrow continental shelves) remained isolated over periods of low sea level, and its populations presented higher genetic differentiation and lineages endemism than southern populations. These results support the influence of the extension of the continental shelves on the diversification pattern and genetic structure of *A. brasiliensis*. In the second model, we assessed the genetic structure of the *pintado* *Pseudoplatystoma corruscans* from the Upper Paraná River to test if this species presents homing behavior. The genetic differentiation among the reproductive populations (inferred from their larvae) from the Amambai River and those from the Ivinheima River and Ivaí River, and the mixture of populations along the main channel (Paraná River – feeding area) support that *P. corruscans* perform homing. However, the lack of genetic differentiation between the populations of larvae from Ivaí River and Ivinheima River suggests that other factors are preventing the genetic differentiation among these populations, as such the Porto Primavera dam (upstream). In this way, we developed a mathematical model to test the effect of dams on populations that exhibit homing behavior. Our simulations support that those populations present reduced genetic differentiation as results of the isolation of the individuals of their reproductive sites by dams, mostly in the rivers adjacent to them. These results support that *P. corruscans* performs homing, but the Porto Primavera homogenized genetically the populations from the Ivinheima River and the Ivaí River. Finally, our results exemplify how capacities (migration and homing) and opportunities (cycles of isolation and expansion, dendritic network of rivers) work interactively and determine the genetic structure and diversification patterns of neotropical fishes. This approach allows us to understand which

factors determine the current biodiversity and to base the development of conservation programs that maintain the evolutionary potentials of Neotropical fish species.

Keywords: *Atherinella brasiliensis*, Conservation Genetics, Dams, Hybrids, Homing, Fish larvae, Mathematical models, *Pseudoplatystoma corruscans*, Taxon Pulse.

INTRODUÇÃO GERAL

As espécies e os indivíduos que as compõe carregam tanto de sua história que suas características são em grande parte resultado de seu passado (Brooks e McLennan 2002, Brooks e Agosta 2012). Suas propriedades biológicas (capacidades) e os fatores bióticos e abióticos que os cercam (oportunidades) interagem em diferentes níveis de complexidade em um contínuo no espaço e no tempo, gerando o mosaico de padrões biológicos observados atualmente (Rickefts 2004, Brooks e Agosta 2012, Araújo *et al.* 2015). A ictiofauna neotropical, por exemplo, é a mais diversificada do mundo, apresentando mais de 4500 espécies descritas (Albert *et al.* 2011) e 8000 estimadas (Schaefer 1998, Vari e Malabarba 1998), resultado da evolução de seus grupos influenciada por eventos tanto históricos quanto ecológicos ao longo dos últimos milhões de anos (Weitzman *et al.* 1988, Ribeiro *et al.* 2006, Dias *et al.* 2014, Roxo *et al.* 2014, Thomaz *et al.* 2015, Tschá *et al.* dados não publicados). Avaliar quais são os fatores que a geram e como ocorre essa interação (oportunidade e capacidade) é essencial para entender os mecanismos que determinam a biodiversidade presente (Dias *et al.* 2014).

Dentre a ampla gama de fatores que influenciam os padrões biológicos, conexões históricas e atuais afetam o fluxo gênico entre populações, e ambas possuem relevância na distribuição contemporânea das espécies e de seus genes (Freeland 2005). Essas conexões resultam da interação da capacidade de dispersão da espécie (*e.g.* comportamento, fisiologia) com as oportunidades (*e.g.* ambientes distribuídos em manchas, redes) para as realizar ao longo do tempo (processos históricos e contemporâneos), gerando os padrões de estrutura genética e diversificação das espécies observados atualmente.

Esse trabalho tem como objetivo explorar, através de marcadores moleculares, como as características biológicas e ambientais (capacidade e oportunidade) se relacionam ao longo de diferentes escalas de tempo para formar os padrões de estrutura genética e diversificação de espécies de peixes neotropicais. Esses aspectos são avaliados através de dois modelos com diferentes escadas temporais: o padrão de diversificação de espécies de peixes estuarinas durante ciclos de isolamento e conexão oportunizados por movimentos eustáticos; a estrutura genética de espécies de peixes dulcícolas com capacidade de realizar *homing*, oportunizada pela heterogeneidade ambiental e pelo padrão dendrítico de bacias hidrográficas.

No primeiro modelo (**Capítulo I**) é testada a influência do tamanho da plataforma continental sobre a estrutura genética e diversificação da espécie estuarina *Atherinella brasiliensis* (Quoy e Gaimard 1825) durante movimentos eustáticos. Regiões com plataforma continental extensa (*e.g.* sul do Brasil) possibilitam maiores taxas de confluência entre estuários e bacias, e conseqüentemente maior fluxo gênico entre populações e intercâmbio

de espécies entre comunidades, durante períodos de baixa do nível do mar, do que regiões com plataforma continental estreita (e.g. nordeste brasileiro). Dessa forma, espera-se encontrar menores taxas de diferenciação genética e endemismo de linhagens na regiões paleo-conectadas. Alternativamente, eventos cíclicos de isolamento (alta do nível do mar) e conexão (baixa do nível do mar) podem proporcionar pulsos de diversificação alopátrica e sua expansão, respectivamente, possibilitando que populações provenientes de locais com a plataforma continental extensa apresentem diversificação por *Taxon Pulse* (Erwin 1979, 1981, 1985, Brooks e McLennan 2002). Essas hipóteses são testadas nesse capítulo a partir de sequências mitocondriais (Citocromo B e D-loop) de seis populações de *A. brasiliensis* ao longo do litoral brasileiro.

No segundo modelo, é avaliado o padrão de estrutura genético de peixes neotropicais como resultado da interação de fatores comportamentais (*i.e. homing*) com características ambientais naturais e antrópicas. Comportamento é o conjunto de respostas dos indivíduos a condições ou estímulos particulares, sendo fortemente influenciado pela história evolutiva da espécie (Freeland 2005). Em peixes, por exemplo, movimentos migratórios e *homing*, retorno dos indivíduos ao local natal para reprodução em detrimento a outros locais igualmente prováveis (Gerking 1959), permitem posicionar os indivíduos diretamente nos habitats com melhores condições ambientais, maximizando a sobrevivência, o crescimento e a abundância das espécies (Barthen e Goulding 1997, Hansen *et al.* 2002, 2007, Hilborn *et al.* 2003, Wollebæk *et al.* 2011, Junge *et al.* 2014).

Em populações que realizam comportamento de *homing*, espera-se encontrar um padrão dendrítico de estrutura genética (Bouza *et al.* 1999, Primmer *et al.* 2006, Wollebæk *et al.* 2011, Östergren *et al.* 2012), com diferenças genéticas entre as populações das áreas de reprodução (corredeiras, geralmente nos tributários), resultado da fidelidade ao local de desova, e mistura genética nas áreas de alimentação (regiões baixas dos tributários e calha principal).

Com base nisso, no **Capítulo II**, a hipótese de que o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz 1829), realiza *homing* é testada através da análise do padrão de estrutura genético da espécie na bacia do Alto Rio Paraná, inferida através marcadores microssatélites e mitocondriais (D-loop). Nesse capítulo, uma nova abordagem para o teste de hipótese de *homing* é proposta, na qual a diversidade genética dos sítios de reprodução é avaliada a partir de larvas da espécie alvo coletadas nas partes baixas dos tributários. Para a realização desse teste de hipótese, inicialmente foi necessário a utilização de ferramentas moleculares para a identificação das larvas de *P. corruscans* e para o teste da presença de

híbridos com *P. reticulatum*. Esse protocolo e seus resultados são descritos no **Capítulo III**, em formato de nota científica.

Por fim, no **Capítulo IV**, é avaliado o impacto de barragens (evento contemporâneo - oportunidade) sobre os padrões de estrutura genética de populações de peixes que realizam *homing* (capacidade). Essas populações podem ser especialmente afetadas por tais empreendimentos, com isolamento de indivíduos entre seus sítios de alimentação e reprodução, promovendo a perda de diversidade e a homogeneização genética entre populações. Dessa forma, nesse capítulo, um modelo matemático foi desenvolvido para avaliar o impacto de barragens sobre a diferenciação genética de populações que realizam *homing*, conhecimento importante para a definição de estratégias de conservação dessas populações em ambientes já represados e naqueles que barragens serão construídas.

Estudos dessa natureza possuem grande importância para entender como as características biológicas e ambientais interagem ao longo do tempo para a formação dos padrões contemporâneos de estrutura genética e diversificação de peixes. Assim, possibilitam prever como ocorrerá a evolução das espécies de peixes neotropicais a curto, médio e longo prazo (e.g. construção de barragens, variações climáticas), e definir as melhores estratégias para manutenção de sua estrutura genética e de seus potenciais evolutivos.

Referências Bibliográficas

Albert JS, Petry P, Reis RE. 2011. Major biogeography and phylogenetics patterns. In: Albert JS, Reis RE (Eds.) *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*. Los Angeles, University of California Press, 21-58.

Araujo SBL, Braga MP, Brooks DR, Agosta SJ, Hoberg EP, Von Hartenthal FW, Boeger WA. 2015. Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. *PLoS One* **10**, e01339225.

Barthem RB, Goulding M. 1997. *Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá/CNPq. Tefé, 144 p.

Bouza C, Arias J, Castro J, Sánchez L, Martínez P. 1999. Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta* L. at the Southern limit of the distribution range of the anadromous form. *Molecular Ecology* **8**, 1991–2001.

Brooks DR, Agosta SJ. 2012. Children of time: The extended synthesis and major metaphors of evolution. *Zoologia* **29**, 497-514.

Brooks DR, McLennan DA. 2002. *The nature of diversity: an evolutionary voyage of discovery*. University of Chicago Press, Chicago, 676p.

Dias MS, Oberdorff T, Huguény B, Leprieur F, Jézéquel C, Cornu JF, Brosse S, Grenouillet G, Tedesco PA. 2014. Global imprint of historical connectivity on freshwater fish biodiversity. *Ecology Letters* **17**, 1130–1140.

Erwin TL. 1979. Thoughts on the evolutionary history of ground beetles: hypotheses generated from comparative faunal analyses of lowland forest sites in temperate and tropical regions. In: Erwin TL, Ball GE, Whitehead DR. *Carabid beetles – their evolution, natural history, and classification*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 539–592.

Erwin TL. 1981. Taxon pulses, vicariance, and dispersal: an evolutionary synthesis illustrated by carabid beetles. In Nelson G, Rosen DE. *Vicariance biogeography – a critique*, Columbia University Press, New York, 159–196.

Erwin TL. 1985. The taxon pulse: a general pattern of lineage radiation and extinction among carabid beetles. In Ball GE. *Taxonomy, Phylogeny and Biogeography of Beetles and Ants*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 437–472.

Freeland J. 2005. *Molecular Ecology*. Wiley, Inglaterra, 402p.

Gerking SD. 1959. The restricted movement of fish populations. *Biological Review* **34**, 221–242.

- Hansen MM, Rzzante DE, Nielsen EE, Bekkevold D, Mensberg KLD. 2002. Long-term effective population sizes, temporal stability of genetic composition and potential for local adaptation in anadromous brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Molecular Ecology* **11**, 2523-2535.
- Hansen MM, Skaala Ø, Jensen LF, Bekkevold D, Mensberg KL. 2007. Gene flow, effective population size and selection at major histocompatibility complex genes: brown trout in the Hardanger Fjord, Norway. *Molecular Ecology* **16**, 1413–1425.
- Hilborn R, Quinn RP, Schindler DE, Rogers DE. 2003. Biocomplexity and fisheries sustainability. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**, 6564–6568.
- Junge C, Museth J, Hindar K, Kraabøl M, Asbjørn Vøllestad L. 2014. Assessing the consequences of habitat fragmentation for two migratory salmonid fishes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **24**, 297-311.
- Östergren J, Nilsson J, Lundqvist H. 2012. Linking assignment testes with telemetry enhances understanding of spawning migration and homing in sea trout *Salmo trutta* L. *Hydrobiologia* **691**, 123-134.
- Primmer CR, Veselov AJ, Zubchenko A, Poututkin A, Bakhmet I, Koskinen MT. 2006. Isolation by distance with a river system: genetic population structuring of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, in tributaries of the Varzuga River in northwest Russia. *Molecular Ecology* **15**, 653-666.
- Ribeiro AC. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology* **4**, 225-246.
- Ricklefs RE. 2004. A comprehensive framework for global patterns in biodiversity. *Ecology Letters* **7**, 1-15.
- Roxo FF, Albert JS, Silva GSC, Zawadzki CH, Foresti F, Oliveira C. 2014. Molecular phylogeny and Biogeographic history of the armored Neotropical catfish subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyriinae (Siluriformes: Loricariidae). *PLOS one* **9**, e105564.
- Schaefer SA. 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 375 – 400.
- Thomaz AT, Malabarba LR, Bonatto SI, Knowles LL. 2015. Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a

Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, **42**, 2389-2401.

Weitzman SH, Menezes NA, Weitzman MJ. 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: Vanzolini PE, Heyer WR (Eds.) *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (ed. by). Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 379-427.

Vari RP, Malabarba LP. 1998. Neotropical Ichthyology: An Overview. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 1–11.

Wollebæk J, Heggenes J, Røed KH. (2011) Population connectivity: dam migration mitigations and contemporary site fidelity in arctic char. *BMC Evolutionary Biology* **11**, 207.

OBJETIVO GERAL

Explorar como características biológicas (capacidade) e ambientais (oportunidade) se relacionam ao longo de diferentes escalas temporais para formar os padrões de estrutura genética e diversificação de espécies de peixes neotropicais, utilizando, para isso, marcadores moleculares.

CAPÍTULO I

Original Article

Opportunity and Taxon Pulse: How coastal geomorphology may influence the genetic diversification and endemism of estuarine species

Rafael A. Baggio^{a,b,c}, Sergio B. Stoiev^a, Henry L. Spach^{b,d}, Walter A. Boeger^{a,b,c}

^a Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim das Américas, CEP 81531-980, CP 19073, Curitiba, Paraná, Brazil.

^b Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim das Américas, CEP 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim das Américas, CEP 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil.

^d Centro de Ciências do Mar, Universidade Federal do Paraná. Avenida Beira Mar, 83255-000. Pontal do Paraná.

Corresponding author: Rafael A. Baggio. rbaggioufpr@gmail.com. Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim das Américas, CEP 81531-980, CP 19073, Curitiba, Paraná, Brazil. +55 41 33611765.

Running title: Diversification by Taxon Pulse in *Atherinella brasiliensis*.

- Artigo formatado e submetido para *Journal of Biogeography* como *Original Article*

Abstract

Aim Evolutionary diversification results from interaction between the inherited biological characteristics of a lineage (capacity) and the biotic and abiotic environmental factors that create opportunities for differentiation (opportunity). Sea level changes and coastal geomorphology (extension of continental shelves) have affected the pattern of diversification of brackish/freshwater fish populations due the confluence of basins/estuaries during low sea level periods (opportunity), and isolation during high sea level periods. It is hypothesized that populations from basins/estuaries in extensive continental shelves, which have greater potential for confluence, should have more opportunities for gene exchange than those in narrow continental shelves. To test this, we assessed the distribution of genetic diversity and the patterns of diversification of the estuarine silverside, *Atherinella brasiliensis*, from the Brazilian coast.

Location Six estuaries along the southern and northeastern portions of the Brazilian coast

Material and Methods Sequences of the mitochondrial control region (D-loop) and Cytochrome B were used to assess the distribution of genetic diversity and the patterns of diversification of *A. brasiliensis*. The palaeochannels that were exposed along the Brazilian coast during the last glacial maximum were reconstructed using bathymetry data and the GIS method.

Results Populations of *A. brasiliensis* from the estuaries in the northeastern Brazilian coast (narrower and shallower continental shelf) showed higher levels of genetic differentiation and endemism of lineages and haplotypes. By contrast, the populations in the southern coast (broader and deeper continental shelf) presented lower genetic differentiation, lower haplotype and lineage endemism, and greater evidence of genetic exchange among populations, which have resulted in a reticulated relationship between lineages and estuaries. The reconstruction of palaeochannels revealed more connections among basins in the South than in the Northeast.

Main conclusions Our results support the influence of the continental shelf extension and the sea level changes on the diversification of *A. brasiliensis*, and the hypothesis of diversification by Taxon Pulse, associated with the opportunities for expansion during periods of low-sea level and the width of the continental shelf.

Keywords: Brackish water fish, continental shelf, drainages, estuary, paleochannel, sea level changes.

Introduction

Evolutionary diversification results from the interaction between the inherited biological characteristics of a lineage (capacity) and the biotic and abiotic environmental factors that create opportunities for differentiation (see Araujo *et al.*, 2015). Regardless of the level of analysis (e.g. genetic diversity, species diversity/richness), both capacity and opportunity need to be evaluated if the goal is to gain a comprehensive understanding of the diversification patterns of organisms.

There is convincing evidence that habitat availability, climate, and sea level changes have affected the genetic diversity and distribution of marine and estuarine fish species, and have promoted population sub-divisions and genetic divergence (e.g. Beheregaray *et al.*, 2002; Harris & Taylor, 2009; Pil *et al.*, 2011; Chakona *et al.*, 2013; Thomaz *et al.*, 2015). According to the model of Weitzman *et al.* (1988), it is very likely that low sea levels during glacial events allowed adjacent river systems to connect into common estuaries, deltas, or inundated areas (e.g. salt marshes and lagoons), thus facilitating the exchange of freshwater fish species. Subsequently, high sea levels during interglacial periods segregated these rivers, promoting isolation, and facilitating divergence of freshwater/brackish fish lineages. This model has been successfully tested in many regions of the world (e.g. Swartz *et al.*, 2009; Chakona *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2015; Thomaz *et al.*, 2015).

It is a corollary of the model of Weitzman *et al.* (1988) that geomorphological characteristics, such as continental shelf extension, should facilitate contact among organisms in neighboring rivers and estuaries (Unmack *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2014). Hypothetically, during periods of low sea level, comparatively broader continental shelves would offer more extensive areas for the lateral expansion of riverine systems, increasing the probability that separated watercourses will connect into a single basin, or that estuaries will join one another. When these connections happen, lineages that are isolated have the opportunity to disperse into new basins. By contrast, comparatively narrower shelves during low sea level periods result in less connections between neighboring river basins, and less opportunities for faunal exchange. Even though the hypothesis outlined above makes a lot of biological sense, it was not corroborated in the results of Unmack *et al.* (2013), who tested it with *Nannoperca* species from the Australian coast.

This cyclic process of isolation and reconnection (expansion) of populations that inhabit the estuaries/basins of extensive continental shelves is compatible with the concept of diversification by Taxon Pulse (Erwin, 1979, 1981, 1985; Halas *et al.*, 2005), which predicts that cyclic events of isolation and biotic expansion generate “pulse-driven biotic diversification” (Halas *et al.*, 2005). According to Halas *et al.* (2005), Taxon Pulse differs from vicariance-

driven biotic diversification in three important ways. First, as a result of Taxon Pulse we expect to find general patterns associated with dispersal, since diversification is driven by biotic expansion in addition to vicariance. General patterns resulting from biotic expansion occur when barriers to dispersal break down. Second, episodes of biotic expansion, even those involving large areas, will inevitably lead to reticulated historical relationships among areas, and biotas within areas of endemism will include species/lineages of different ages derived from different sources. Third, when biotic expansion is being considered, the most parsimonious explanation for the absence of a clade from a certain area where it was predicted to occur is that the lineage failed to participate in that particular expansion episode. In the case of vicariance-driven diversification hypotheses, the simpler explanation is dispersal followed by extinction. In riverine systems, periods of isolation (during high sea levels) offer opportunities for divergence through vicariance, while expansion periods (during low sea levels) allow organisms to disperse among neighboring estuarine/river systems. Repeated cycles of expansion and isolation should produce reticulated areas of distribution in which lineages originating in one river basin during isolation, expand to neighboring basins. When these areas become isolated again, the populations could differentiate.

The geomorphology of the Brazilian coast is ideal to test the predictions outlined above. The coast is 7.408 km long and the depth and width of its continental shelves are conspicuously different in different regions (see Fig. 1). In northeastern Brazil, for example, the continental shelf is narrow and shallow (i.e. between 10 and 100 km width, mean of the depth of shelf break in -60 m), while in the south it is broader and deeper (i.e. between 50 and 230 km width and shelf break between -100 and -180 m) (Vital *et al.*, 2005, 2010). Numerous hydrologic basins that discharge into the southwestern Atlantic Ocean are present in this geomorphological scenario, providing distinct opportunities for expansion during low sea level periods (see Albert & Reis, 2011). For this reason, it is expected that freshwater/estuarine populations from the south and northeast will have responded differently to the sea level fluctuations that happened in the Late Pleistocene and Holocene. During the Late Pleistocene and Holocene, the sea level varied between +8 m, at 123 ka, -120 m during the last glacial maximum (LGM – 20ka), and +2.5 m at 5 ka (Suguio *et al.*, 1985; Correa *et al.*, 1996; Knoppers *et al.*, 1999).

We predict that the diversification pattern of estuarine species will be more conspicuous in species that are highly dependent on estuarine environs, such as *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1825) (Atheriniformes: Atherinopsidae), popularly known as the silverside (or *peixe rei*, as it is popularly known in Brazil). This species inhabits estuaries of the eastern coast of South America, between Venezuela and Rio Grande do Sul (Brazil) (Figueiredo & Menezes, 1978; Barbieri *et al.*, 1991; Araújo & Azevedo, 2001; Pessanha & Araújo, 2001),

being one of the most abundant species in the estuaries of the southern and southeastern Brazilian coast (Garcia *et al.*, 2001; Pessanha & Araújo, 2001; Barreiros *et al.*, 2004; Vendel & Chaves, 2006). Two biological characteristics of *A. brasiliensis* suggest that stocks of this lineage are isolated along the Brazilian coast. First, silverside reproduction is highly dependent on estuaries and a considerable part of the species' life cycle occurs in this environment (Neves *et al.*, 2006). Spawning occurs at estuarine inlets, in calm and shallow waters with great abundance of vegetation (Bemvenuti, 1987), which acts as a substrate for the silverside's adhesive eggs (Fávaro *et al.*, 2003). Second, there is no record of dispersions of *A. brasiliensis* along the coast and the species is considered a strict estuarine resident (Hostim-Silva *et al.*, 1995). Therefore, the distribution of the genetic diversity of populations of *A. brasiliensis* should represent an exceptional model to test the hypothesis of Taxon Pulse, which putatively influenced the diversity of freshwater and strictly estuarine fishes.

In order to test the predictions of the Taxon Pulse hypothesis, we analyzed the distribution of the genetic diversity of selected populations of *A. brasiliensis* along stretches of the Brazilian coast that differ in the width of the neighboring continental shelves. Following the predictions of the Taxon Pulse, the populations of *A. brasiliensis* at the northeastern Brazilian coast (with narrow continental shelves) will have higher levels of genetic structure, greater lineage endemism, and smaller percentages of shared haplotype lineages (lineages reticulation), reflecting limited historical genetic exchange among populations when compared with populations inhabiting the southern estuaries (with more extensive continental shelves). Our results suggest that diversification in the southern estuaries was strongly influenced by the opportunities for expansion during periods of low-sea level associated with the width of the continental shelf, thus corroborating the predictions of the Taxon Pulse.

Material and Methods

Samples

One-hundred-and-thirty specimens of *A. brasiliensis* were sampled from six estuaries of the Brazilian coast (Jaguaribe River, Pontal Bay, Piraquê-Açu River, Paranaguá Bay, Babitonga Bay, Patos Lagoon estuaries - see number of individuals, sampling points and its geographic coordinates on the Tab. 1 and the map in the Fig. 1). They are located at the southern half of the distribution range of the species. The continental shelf is wide at three locations (southern portion: Paranaguá Bay, Patos Lagoon, Babitonga Bay estuaries), while at the other three locations it is narrower (northeastern portion: Jaguaribe River, Pontal Bay, Piraquê-Açu River) (Fig. 1). Specimens were identified based on their morphology according to Figueiredo & Menezes (1978). Representative specimens were deposited in the Museu de

História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Brazil (access numbers MHNCI 13001 to 13008). Gill arches and livers were preserved in EDTA-DMSO buffer (Seutin *et al.*, 1991) at -20°C.

Sequencing

Total DNA was isolated using EZ-DNA kit (Biological Industries). The mitochondrial control region (D-loop) was amplified using the primers H16498 (Meyer *et al.*, 1990) and L15774M (Prioli *et al.*, 2002) and the Cytochrome B gene (CytB) was amplified using the primer pair GLUDG.L (Palumbi, 1996) and H16460 (Perdices & Doadrio, 2001). The 25 μL PCR reaction included 1 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ of DNA template, 1x Buffer, 3.75 mM of MgCl_2 , 0.075 $\text{U } \mu\text{l}^{-1}$ Taq polymerase, 0.625 mM of each dNTP, 1.25 μM of each primer and 0.5 μl of bovine serum albumin (BSA) 1%. The PCR program was as follows: initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles at 94°C for 45 s, 60°C for 45 s (52°C for CytB) and 72°C for 60 s, and a final extension at 72°C for 5 min. Every PCR product successfully amplified was purified with PEG 8000 (Amresco Inc.). Sequencing reactions with 10 μl solution included 5 \times buffer, 0.16 μM of each primer, 0.5 μl of BigDye (Applied Biosystems) and 4 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ of DNA template of each purified product in a program with initial denaturation at 96°C for 1 min, followed by 35 cycles at 96°C for 1 min, 50°C for 10 s and 60°C for 4 min. The final product was purified using Sephadex™ G-50 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) and sequenced on an ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Both strands of each fragment were sequenced to confirm sequences, and the consensus sequences were aligned using ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). The amino acid coding of the CytB sequences were checked to assess errors in the sequences.

Genetic analyses

Diversity (i.e. number of haplotypes, number of polymorphic sites, nucleotide diversity), neutral (i.e. Tajima's D, Fu's F_s) and genetic structure (i.e. F_{st} , AMOVA) analyses were implemented in Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Genetic structure analyses were carried out with the concatenated D-loop + CytB input. A hierarchical AMOVA analysis was performed to test the effect of the extension of the continental shelf on the genetic structure of *A. brasiliensis* populations. The populations from southern Brazil were grouped in a group as they putatively connected during low sea level period and another composed by the populations from northeastern Brazil which, we postulate, remains non-connected during low sea level periods. A Mantel test was used to test isolation-by-distance in Arlequin 3.5 using F_{st} values. Bonferroni correction of the significance level of the indices was used whenever multiple comparisons were performed. A haplotype network to each fragment was estimated in Network 5.0.0.0 using the median-joining method (Bandelt *et al.*, 1999).

Table 1 Sampling points and their geographic coordinates, number of individuals sampled (N) and sequenced of each mitochondrial fragment (N_s), haplotypes (H), polymorphic sites (s), nucleotide diversity (π), Fu's F_s and Tajima's D of *A. brasiliensis* populations sampled from Brazilian coast estuaries. * indicates significant values ($p < 0.02$ to Fu's F_s , $p < 0.05$ to Tajima's D).

Sampling Points	Coordinates	N	D-loop						Cyt B					
			N_s	H	s	π	F_s	D	N_s	H	s	π	F_s	D
Jaguaribe River	7° 43' 55"S 34° 50' 6"W	20	20	10	11	0.004 ± 0.003	-27.4*	-1.54*	19	14	14	0.002 ± 0.002	-26.3*	-1.55*
Pontal Bay	14° 48' 41"S 39° 1' 50"W	25	23	10	8	0.005 ± 0.003	-27.0*	-0.16	25	8	8	0.001 ± 0.001	-28.5*	-1.33
Piraquê-Açu River	19° 57' 9"S 40° 9' 15"W	25	20	5	4	0.001 ± 0.001	-3.4 e38*	-1.43*	25	4	3	0.001 ± 0.001	-3.4 e38*	-1.11
Paranaguá Bay	25° 33' 33"S 48° 21' 43"W	20	18	10	11	0.004 ± 0.003	-27.1*	-1.61	16	9	10	0.002 ± 0.002	-23.4*	-1.45
Babitonga Bay	26° 11' 18"S 48° 36' 50"W	20	20	10	11	0.004 ± 0.003	-27.8*	-1.7	20	15	26	0.004 ± 0.002	-25.1*	-2.25*
Patos Lagoon	32° 2' 10"S 52° 2' 20"W	20	20	5	4	0.003 ± 0.002	-28.5*	0.38	20	9	12	0.002 ± 0.002	-27.0*	-1.34
All populations		130	121	46	51	0.025 ± 0.012	-24.3*	0.52	125	73	106	0.026 ± 0.013	-23.9*	0.34

Coalescent methods were used to explore evolutionary process and demographic events that may have influenced the pattern and distribution of the genetic variation of *A. brasiliensis* populations. Since these methods add time dimensions to the analyses, coalescence is more powerful than conventional analyses that use only the current distribution of genetic diversity (Frankham *et al.*, 2004). Effective population size and long-term dispersion rates between adjacent populations were estimated in the software Migrate 3.1.6 (Beerli, 2008) with Bayesian inference. Priors were obtained in a default run and the stepping stone model (Kimura, 1953) was used in two runs with three replicate analysis, recorded 30 million steps each, four Markov chains with heating defined at 1, 1.5, 3 and 10,000 and a 10% burn-in. The historical demography of the populations was inferred in a Bayesian Skyline Plot (BSP) analysis, which accesses the effective population sizes (N_e) through time (Drummond *et al.*, 2005).

A calibrated phylogenetic tree was constructed to assess the relationship and the divergence time among the populations in Beast 1.8.0 (Drummond *et al.*, 2012) with four independent runs of 50 millions MCMC, sampled at each 1,000 trees, 10% burn-in and strict molecular clock, to access the phylogenetic relationships and divergence time among populations. The tree was rooted at the midpoint of the longest distance across the tree. A run with 50 million MCMC sampled each 1000 with relaxed lognormal clock was done to test this assumption, according to the recommendation of Drummond *et al.* (2007). There is no good estimation of the mutation rate in Atherinopsidae. In this way, we used the mutation rate reported for the Atherinidae *Atherinomorus endrachtensis* (Quoy & Gaimard, 1825) by Gotoh *et al.* (2011) - 10% per Myr in this reconstruction. The substitution models were defined by jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008).

The history of expansion (dispersion)/isolation (vicariance) of the haplotype lineages in the different areas of distribution was reconstructed on the haplotype tree, using the protocol proposed by Lieberman (2000, 2003a,b). Lineages Through Time Plot was obtained with APE (Paradis *et al.*, 2004) in the R environment. Both results were contrasted with the curve of sea-level variation presented by Siddall *et al.* (2003).

The palaeo-rivers along the Brazilian coast during the LGM were estimated using the bathymetry data (30 arc-second interval grid) of the General Bathymetric Chart of the Oceans (GEBCO – www.gebco.net) in ArcGIS 10 (see Thomaz *et al.*, 2015 for more details).

Results

Coastal geomorphology

Reconstruction of the palaeo-basins based on the bathymetry data along the Brazilian coast indicates greater confluence among currently isolated basins of the wider continental shelves during the LGM (Fig. 1). Most basins of the northeastern Brazilian coast (narrow continental shelf) remained isolated during periods of low sea level. Alternatively, the degree of confluence among currently isolated basins in southern Brazil (wider continental shelf) was greater during the LGM. Most of the southern basins were connected through palaeo-drainages, although the reconstruction does not support the connection among the estuaries sampled (see limitations of the method below).

Genetic diversity and structure

A total of 121 sequences of the mtDNA control-region (D-loop), each 448 pb long, and 125 sequences of the mtDNA Cytochrome B gene (CytB), each 820 pb long, were obtained (GenBank KT937287 to KT937389) for *A. brasiliensis*. They had 51 and 106 polymorphic sites distributed among 46 and 57 haplotypes, respectively (Tab. 1). The nucleotide diversity of the D-loop varied between 0.001 (Piraquê-Açu River) and 0.005 (Pontal Bay) and of the CytB varied between 0.001 (Pontal Bay and Piraquê-Açu River) and 0.004 (Babitonga Bay) (Tab. 1).

Fst analyses (global Fst = 0.930, $p < 0.001$) indicate the existence of geographically-structured populations. Pairwise Fst comparisons support that all populations are highly differentiated genetically ($p < 0.003$ after Bonferroni Correction), except the populations from the Paranaguá Bay and Babitonga Bay (Tab. 2). Accordingly, subpopulations of the Paranaguá Bay and Babitonga Bay were considered to represent a single population (Paranaguá Bay + Babitonga Bay) in the BSP and in the dispersion analyses. The Mantel test supported isolation-by-distance: 33.6% of the genetic variation in Fst values among areas could be explained by distance ($p = 0.010$). However, this pattern is not observed when only southern populations are analyzed ($R^2 = 0.996$, $p = 0.166$), or when Paranaguá Bay and Babitonga Bay populations are clustered in an all populations analysis ($R^2 = 0.110$, $p = 0.142$). The hierarchical AMOVA support the effect of differences on the connection among estuaries during low sea level periods. A total of 92,2% of the genetic variation comes from among groups level (Jaguaribe River, Pontal Bay, Piraquê-Açu and southern populations), 0.7% comes from within groups level and 7.1% comes from within populations.

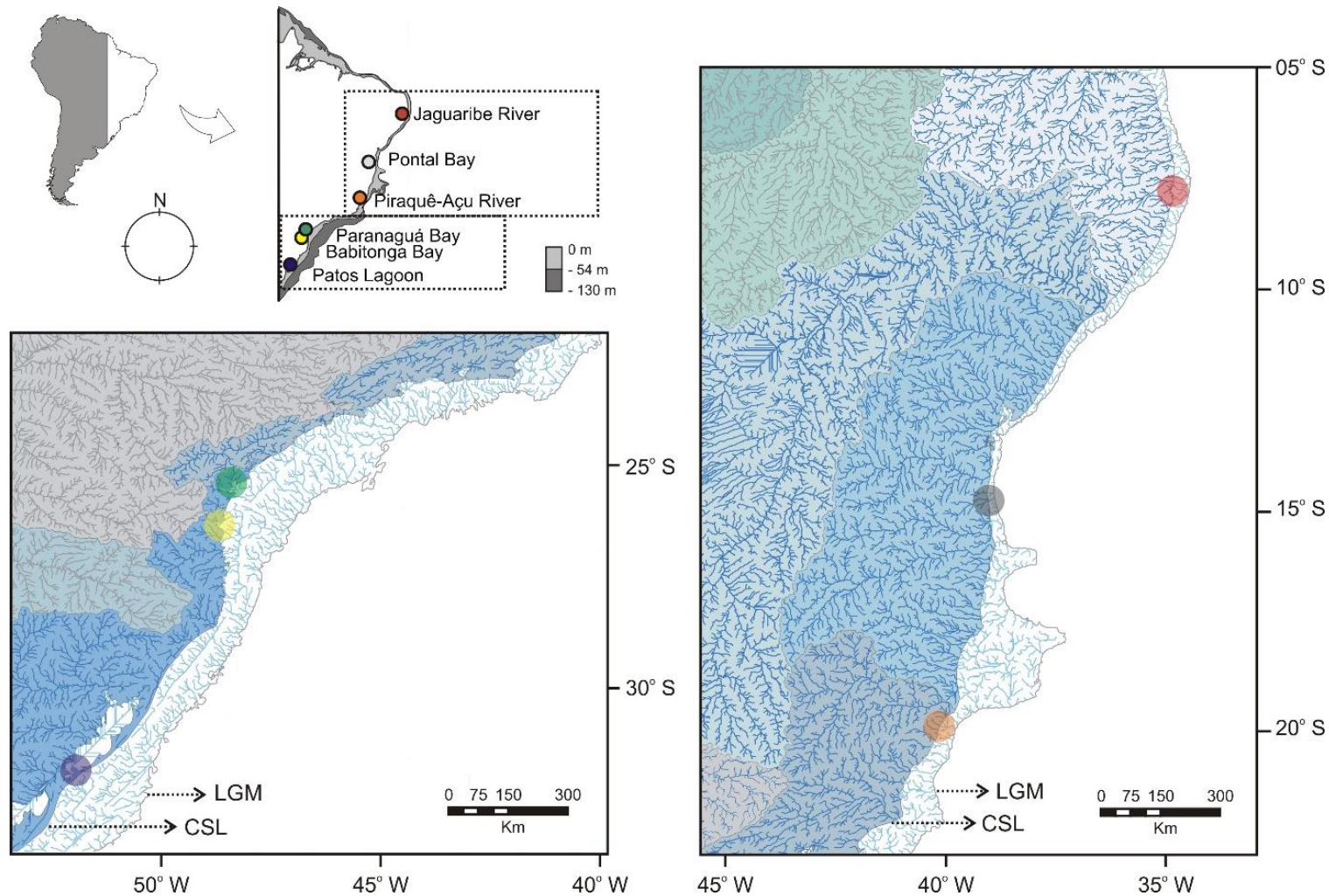


Figure 1. Map of the six sampling points and the palaeo-rivers exposed during the Last Glacial Maximum (LGM), when the shoreline (SLGM) was 120 m lower than the current shoreline (CSL). Different colors represent different Brazilian freshwater ecoregions. The dark blue channels represent current rivers and the light blue channels represent the palaeochannels of the analyzed region.

Table 2. Genetic differentiation (F_{st} , below diagonal) and its respective p-value (above diagonal) among *A. brasiliensis* populations, based on concatenated D-loop and CytB sequences. Asterisks indicate significance after Bonferroni correction ($p < 0.003$) in F_{st} analysis.

	Jaguaribe River	Pontal Bay	Piraquê-Açu River	Paranaguá Bay	Babitonga Bay	Patos Lagoon
Jaguaribe River		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Pontal Bay	0.956*		0.000	0.000	0.000	0.000
Piraquê-Açu River	0.969*	0.917*		0.000	0.000	0.000
Paranaguá Bay	0.945*	0.866*	0.931*		0.938	0.001
Babitonga Bay	0.939*	0.853*	0.912*	0.000		0.000
Patos Lagoon	0.937*	0.869*	0.928*	0.111*	0.108*	

Haplotype networks clearly separate the northeastern populations (shorter continental shelf) into independent groups (haplogroups, Fig. 2) with elevated genetic distances among them (Jaguaribe River, Pontal Bay, Piraquê-Açu River). There were exclusive haplotypes in each location sampled in the northeastern estuaries. By contrast, the southern populations (Paranaguá Bay, Babitonga Bay and Patos Lagoon - broader continental shelf) shared the same haplotypes or closely related haplotypes.

These contrasting patterns between northeastern and southern populations are supported by the Bayesian inference of historical dispersion rates (Tab. 3). Greater historical dispersion rates were found among the southern populations (1270.1, 95% HPC: 678.4 – 1941.7, from the Patos Lagoon to Paranaguá Bay + Babitonga Bay; 383.8, 95% HPC: 0.0 – 993.3, from Paranaguá Bay + Babitonga Bay to the Patos Lagoon). Moreover, this analysis suggests high variance of effective population size (i.e. theta, Tab. 3). The theta of Paranaguá Bay + Babitonga Bay population presents the greatest value ($\theta = 0.148$, 95% HPC: 0.040 - 0.262) while the Piraquê-Açu River population presents the lowest ($\theta = 0.002$, 95% HPC: 0.000 – 0.008).

The test of the molecular clock hypothesis supported a lack of significant variation in the clock rates among the lineages of the tree (mean of $uclid.stdev$ D-loop = 0.167, 95% HPD: 0.00 – 0.45; $uclid.stdev$ CytB = 0.214, HPD: 0.00 - 0.58). Therefore, the ultrametric tree was rooted according to the molecular clock. The haplotypes from the Jaguaribe River clustered in a single clade, sister to the clade of haplotypes from other locations. The remaining haplotypes clustered in two large sister clades: the first composed of clades from the Pontal Bay and Piraquê-Açu River, respectively, with no shared haplotypes; and the second composed of lineages from the Paranaguá Bay, Babitonga Bay, and Patos Lagoon, mixed in a large monophyletic group (Fig. 3). The divergence time between the clade including the lineages from the Jaguaribe River and the remaining group was estimated at about 601 ka (95% HPD:

353 – 912 ka). The diversification of the remaining lineages occurred more recently, at 189 ka (95% HPD: 104 – 266 ka) between Paranaguá Bay + Babitonga Bay + Patos Lagoon and Pontal Bay + Piraquê-Açu populations, and 139 ka (95% HPD: 73 - 199 ka) between the last two populations. The calculated CytB gene mutation rate was 7.89% Myr⁻¹ (HPD: 4.72 - 11.41% Myr⁻¹).

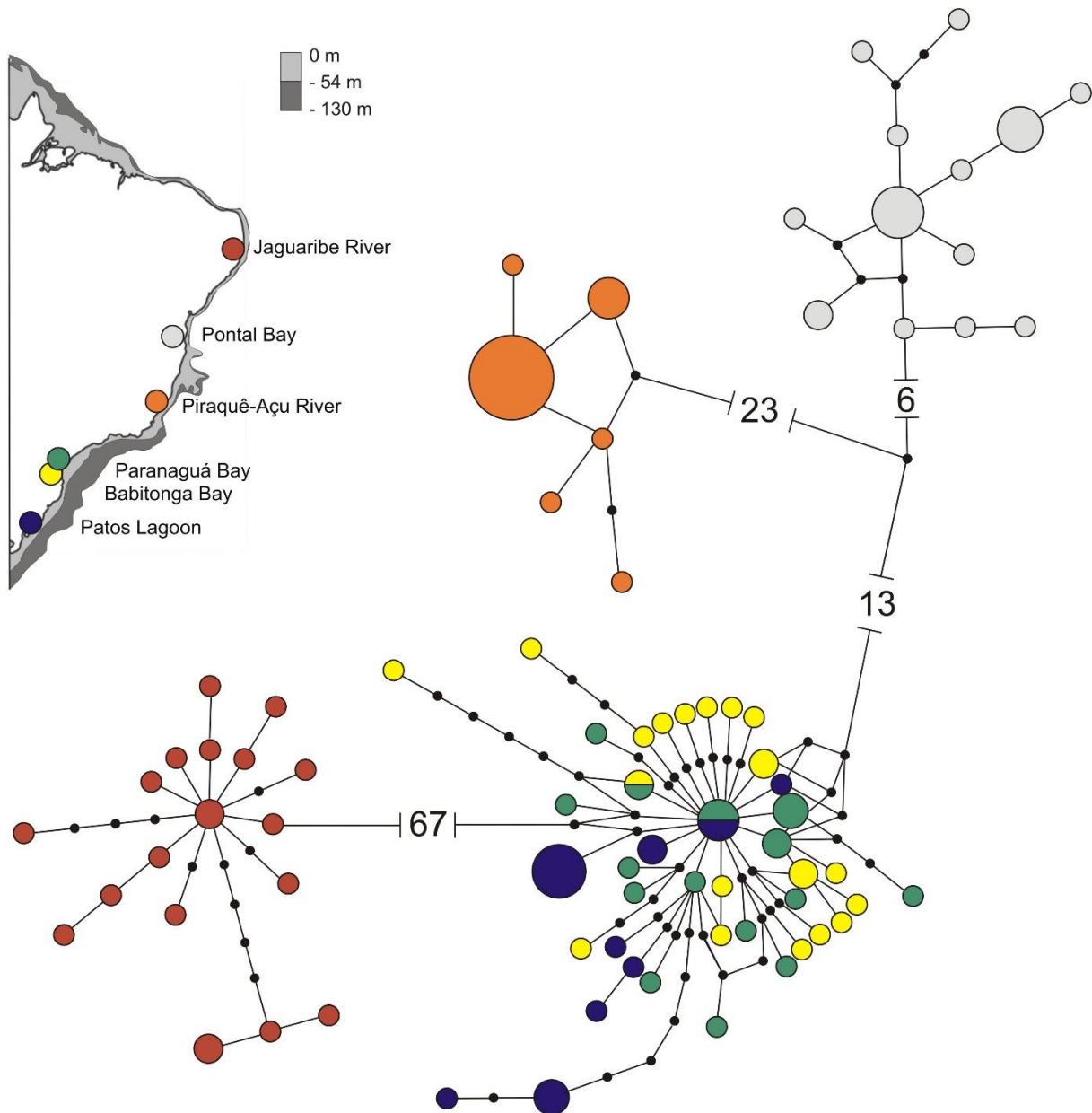


Figure 2. Haplotypes network of mitochondrial DNA control region (D-loop) and Cytochrome B (CytB) of *A. brasiliensis* from Brazilian coast. The size of the circles is proportional to the number of individuals belonging to a specific haplotype. Their colors represent the sampling points, points indicate haplotypes not sampled and each line represents a mutation step.

Table 3 Effective population size (i.e. Theta value) and dispersion rates among *A. brasiliensis* populations from the Brazilian coast, assuming Stepping Stone model. HPC: highest probability density.

	Population Effective Size		Dispersion to adjacent southern population		Dispersion to adjacent northern population	
	Mean	95% HPC	Mean	95% HPC	Mean	95% HPC
Jaguaribe River	0.009	0.001 - 0.018	34.1	0.0 - 105.0		
Pontal Bay	0.005	0.000 - 0.011	98.7	0.0 - 318.3	50.0	0.0 - 125.0
Piraque-Açu River	0.002	0.000 - 0.008	27.6	0.0 - 86.7	120.2	0.0 - 276.7
Paranaguá Bay + Babitonga Bay	0.148	0.040 - 0.262	383.8	0.0 - 993.3	163.3	0.0 - 418.3
Patos Lagoon	0.004	0.000 - 0.009			1270.1	678.4 - 1941.7

The phylogenetic history of the lineages in the different areas of distribution indicates that recent haplotype expansion occurred only in the southern populations, likely during the last low-sea level event, during and after the Last Glacial Period: 18 dispersion (30.5%) and 1 isolation (1.7%) among the 59 cladogenetic events (Fig. 4). Alternatively, the most recent diversification in each clade (Jaguaribe River, Pontal Bay, Piraquê-Açu River, and Paranaguá Bay + Babitonga Bay + Patos Lagoon) happened about 20 - 15 ka, when the sea level was higher than the continental shelf break depth of each region: -60 m in the northeastern estuaries, and -120 m in the southern estuaries (Fig. 3).

Discussion

The analyses revealed a contrast in the pattern of genetic variation between populations of *A. brasiliensis* from northeastern and southern Brazilian estuaries. Whilst populations from the estuaries in the northeastern Brazilian coast (where the continental shelf is narrower and shallower) showed higher levels of genetic differentiation and endemism of lineages and haplotypes, the populations in the southern coast (where the continental shelf is broader and deeper) presented lower genetic differentiation, lower haplotype and lineage endemism, and greater evidence of genetic exchange among populations, which have resulted in a reticulated relationship between lineages and estuaries. These results agree with the predictions of the hypothesis tested here - eustatic sea-level changes and the geomorphology of Brazilian continental shelves have strongly influenced the distribution of genetic diversity of *A. brasiliensis*. As postulated above, the populations of *A. brasiliensis* are strongly disjoint. Adults reside in estuaries and their reproductive characteristics do not favor gene exchange between neighboring populations. As a consequence, genetic exchanges between populations are strongly dependent on direct connections (and, consequently, between neighboring hydrographic basins).

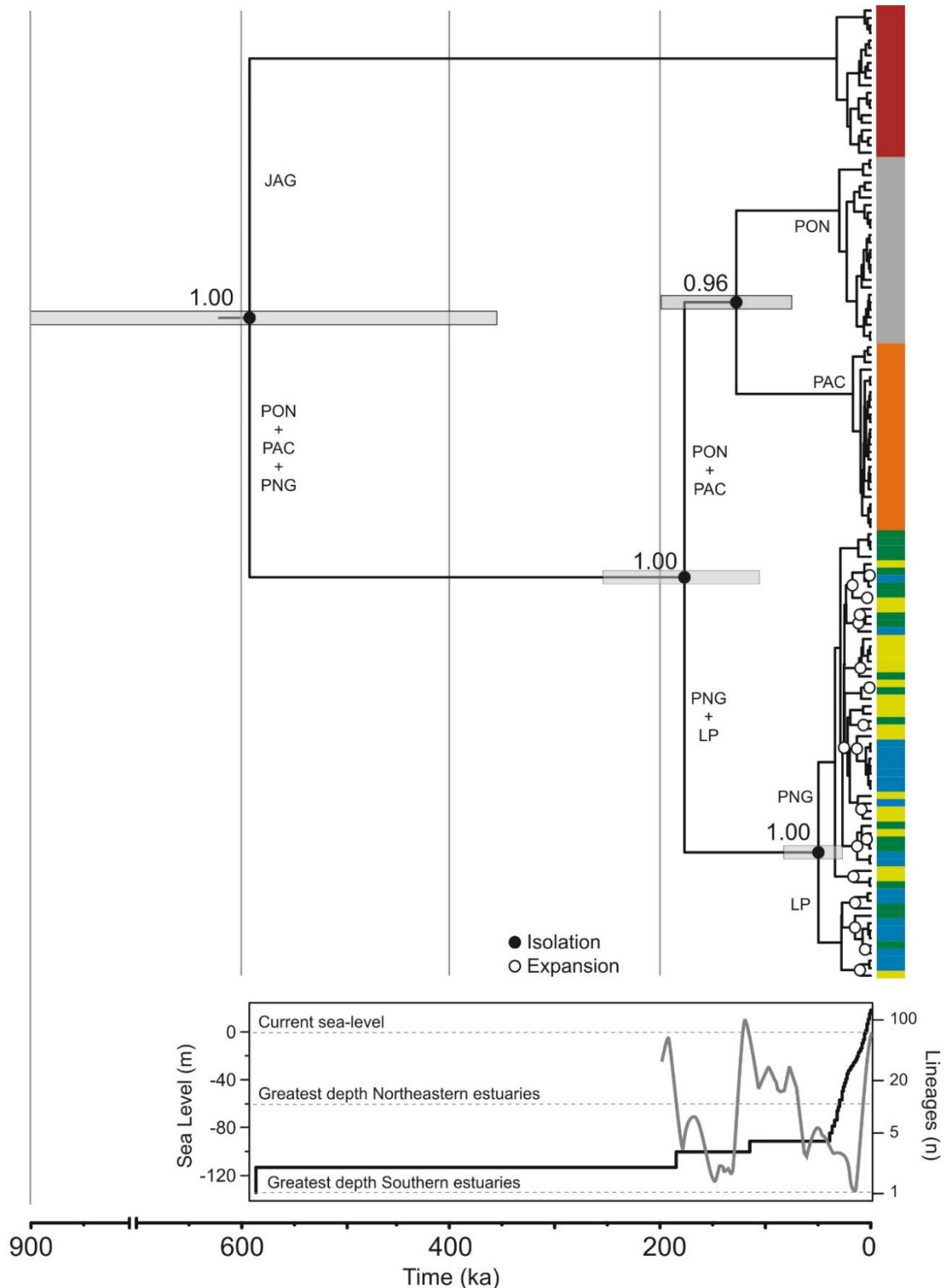


Figure 3 Phylogenetic relationships and the divergence time (in ka) among *A. brasiliensis* populations. Black and white circles represent the reconstruction of the history of isolation/expansion events of the haplotypes along their estimated ancestral area of distribution according Lieberman (2000, 2003a,b) (above). The Lineages Through Time Plot and the sea level fluctuations according Siddall *et al.* (2003) (below). Blue: Patos Lagoon; Yellow: Babitonga Bay; Green: Paranaguá Bay; Orange: Piraquê-Açu River; Gray: Pontal Bay; Red: Jaguaribe River.

The result of the Mantel test indicates that the level of differentiation between populations is correlated with the distance between their estuaries but only when the comparison between populations of northeastern (high F_{st}) and southern (low F_{st}) estuaries are considered. The absence of signal of isolation-by-distance in the analysis with Paranaguá Bay and Babitonga Bay populations clustered supports the absence of genetic differentiation among these near populations is biased against the isolation-by-distance analysis. Furthermore, it is unlikely that the compared patterns of population expansions (resulting in haplotype reticulation) within the southern and northeastern populations may also reflect the distance between the estuaries sampled. There are no observed reticulations among northeastern estuaries. Additionally, despite the fact that the greatest distance between the southern estuaries (i.e. Patos Lagoon and Paranaguá Bay) and the distance between Pontal Bay and Piraquê-Açu (northeastern estuaries) are equivalent, the levels of genetic differentiation within the northeastern and southern estuaries are conspicuously different ($F_{st} = 0.11$ and $F_{st} = 0.92$ respectively). Finally, in general, the estuaries in the northeastern region are more numerous and closer together than estuaries in the southern region (Fig. 1). We would, thus, expect overall lower F_{st} values for the northeastern populations if genetic exchange between populations are frequent and associated with active dispersal of fish, connecting distant population genetically through a stepping-stone dispersion mode. Thus, distance alone cannot justify rejection of the hypothesis that the continental shelf influenced the evolution and distribution of the regional genetic diversity of *A. brasiliensis*.

Expansions of riverine systems during low-sea-level periods (glacial periods) allowed the convergence of basins that are presently isolated (resulting in a common composite basin) or the connection among basins and estuaries through deltas and flooded environments (e.g. lagoons, swamps). This phenomenon has already been documented in other regions of the world (e.g. Weitzman *et al.*, 1988; Swartz *et al.*, 2009; Chakona *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2014; Thomaz *et al.*, 2015). The extent of the confluence of riverine systems putatively depends on the distance between basins and the extension of the continental shelf (Unmack *et al.*, 2013). Both factors influence the possibility of connection between respective hydrographical basins during periods of low-sea level. Populations of estuaries located in regions where the continental shelves are wide (e.g. southern Brazil) putatively have a greater potential to connect in periods of regression than those located at narrow continental shelves (e.g. northeastern Brazil).

The network of palaeochannels predicted in this study and by Thomaz *et al.* (2015) support the hypothesis that the presently-isolated southern Brazilian basins and estuaries expanded laterally and connected extensively during low sea level events (Fig. 1), especially

when associated with wide continental shelves. Additionally, Santos-Filho (2009) hypothesized a channel between the Paranaguá Bay and Babitonga Bay estuaries at -16 and -38 m, which might have created a common estuary when the sea level was lower (between 8 and 22 ka, Correa, 1996; Siddall *et al.*, 2013), preventing genetic differentiation between populations of these two estuarine complexes. Other palaeochannels have been hypothesized for the Brazilian coast (e.g. Abreu & Calliari, 2005; Souza-Junior *et al.*, 2007; Conti & Furtado, 2009; Weschenfelder *et al.*, 2010), which suggests that extensive bays and lagoons were produced by the deepening of fluvial channels during low sea level events. However, these palaeochannels and lagoons and the channel described by Santos-Filho (2009) were not inferred with GEBCO bathymetry data (present data and Thomaz *et al.*, 2015). Differences between actual and bathymetry-based inferences of palaeochannels likely reflect the resolution of available databases. Another complicating factor is that recent erosional/sedimentation processes and tectonic events may also hinder the reconstruction and recognition of pre-existing drainages (Conti, 2009). However, although imperfect, reconstructions of palaeochannels based on publicly-available bathymetry data (i.e. lower resolution) represent an important tool to estimate the expected pattern of palaeodrainages, especially when detailed local reconstruction studies are scarce.

The cyclic episodes of biotic expansion and isolation associated with the cyclic sea level changes detected in the southern populations of *A. brasiliensis* in the Lieberman (2000, 2003a,b) reconstruction (Fig. 3) conform with the predictions of the hypothesis of Taxon Pulse (Erwin, 1979, 1981, 1985; see also Brooks & McLennan, 2001). Isolation events during high sea-level periods provide opportunities for allopatric haplotype diversification of populations, and dispersal events through connections among basins in periods of low sea level provide opportunities for population expansion. These pulses of expansion/isolation produce a reticulated pattern of haplotype distribution throughout populations, which is especially evident in the haplotype network (Fig. 2) and phylogenetic tree (Fig. 3) of the southern populations of *A. brasiliensis*. This scenario suggests cyclic events of Taxon Pulse. Contrasting with the pattern displayed by the southern populations of *A. brasiliensis*, the pattern of genetic differentiation in the northeast does not fit the predictions of the Taxon Pulse. Populations inhabiting the northeastern-estuaries are highly structured genetically (Tab. 2) and present elevated lineage endemism and no reticulation (Fig. 3), which strongly indicates reduced gene exchange even in periods of low sea level.

Similar patterns of genetic distribution in freshwater fish species of small coastal basins suggest that Taxon Pulse associated with eustatic processes may be implicated also in the case of strict freshwater species in the southern Brazilian coast. Comparable cycles of isolation

during periods of high sea level and expansion during periods of low sea level were proposed for freshwater fishes in South Africa (Swartz *et al.*, 2009; Chakona *et al.*, 2013) and for an Indo-Australian freshwater shrimp (De Bruyn & Mather, 2007). In the Brazilian coast, Thomaz *et al.* (2015) reported that 75 % of the genetic variation among populations of the freshwater *Hollandichthys multifasciatus* (Eigenmann & Norris, 1900) from the southern and southeastern Brazilian coasts (wide continental shelf) is associated with the isolation and reconnection of rivers during Pleistocene sea level changes. Pereira *et al.* (2013) reported on a deep genetic divergence among populations of the freshwater fish *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) from the northeastern and southeastern Brazilian coasts, influenced by the conjunction of eustatic sea level fluctuations and the geomorphology of the continental shelf. In both studies, despite the few numbers of individuals sampled, the haplotype composition of many populations is reticulated (22% and 40% of the diversification associated with expansion events, respectively) as for *A. brasiliensis*.

A diversification scenario resulting from the Taxon Pulse hypothesis is, then, the result of intrinsic (inherent capacity of a species) and extrinsic (environmental opportunity) factors that allow the elimination of, or a breach, in barriers to expansion. In the case of *A. brasiliensis*, the factor limiting continuous dispersal is apparently intrinsic, associated with the behavior and ecology of the species (no adult dispersal and larval retention). Expansion, in this case, can only happen when there are physical connections between neighboring watersheds, during low sea level. Populations of the freshwater characin *H. multifasciatus*, by contrast, present significant genetic differentiation (with large levels of endemism of haplotypes and haplotype lineages) (Thomaz *et al.*, 2015), reflecting the biological (intrinsic=capacity) and environmental factors (extrinsic=opportunity) that limit the dispersion and expansion of its lineages even during historical connections between river basins. *Hollandichthys multifasciatus* are more dependent on forested stretches of the stream (Thomaz *et al.*, 2015) and have lower ability to survive in brackish and marine waters than species of Atheriniformes, such as *A. brasiliensis* (Bamber & Henderson, 1988; Souza-Bastos & Freire, 2011; Schultz & McCormick, 2013). Since connection between basins most likely involved areas of brackish water (e.g. delta, lagoons) with distinct marginal biomas, *H. multifasciatus* may have been prevented from dispersing into new basins, contrasting with the estuarine *A. brasiliensis*.

While the concept of Taxon Pulse proposed by Erwin (1979, 1981, 1985) was proposed for species diversification, we concluded that the same general pattern is observed in a lower level of complexity, the distribution of genetic variability of a species populations. We extend this conclusion to propose that this general Taxon Pulse model associated with eustatic movements and with the width of the continental shelf also applies to diversification at higher

levels of complexity of biodiversity. It is very likely that cycles of Taxon Pulse induced by eustatic movements and influenced by the width of the continental shelf have also influenced speciation, endemism, and the phylogenetic diversity of fish communities of coastal streams along the Brazilian coast and similar areas in the world. According to this proposed model, in the northern watersheds, species evolved in continuous allopatry, while in the southern basins species that originated allopatrically dispersed to neighboring basins during periods of low sea level, becoming isolated during periods of high sea level, thus enabling new specific lineages to diverge. As predicted by the model, the percentage of endemic species within each respective community is greater in northeastern watersheds, while species richness per area is greater in southern basins (see Albert & Reis, 2011 for details). Accordingly, Dias *et al.* (2014), in a worldwide study, suggested that basins that were connected by palaeochannels during low sea level events present higher species richness, whereas basins that remained isolated present greater levels of endemism and differences in species composition.

Concluding, our results support that the geomorphology of the continental shelves and sea level fluctuations influenced the genetic diversification of freshwater and estuarine species by Taxon Pulse. The model supports that, independent of the scale of diversity studied (molecular, species and community), wider continental shelves should allow diversification by Taxon Pulse, resulting in greater levels of diversity and reticulation of riverine species, while narrow continental shelves should increase geographic isolation and endemism of regional diversity by reducing the opportunity for expansion.

Acknowledgements

The authors wish to thank FMS Santana, W Severi, GRA Rocha, ECG Couto, JC Joyeux, LB Stocco, JPV Sobrinho, LE. Moraes, CCV de Araújo, BH Makishi, R Schwarz Jr. and C Monteiro-Neto for help with sampling work, and MK Tschá for help with laboratory work and contributions to the analysis process. This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant numbers 474833/2013-5 and 404344/2013-5). WAB and HS are research fellows of the CNPq, Brazil.

Biosketch: Rafael A. Baggio is interested in evolution and conservation of marine and freshwater species. This study is part of his doctoral dissertation in the Molecular Ecology and Evolutionary Parasitology Lab in the Universidade Federal do Paraná.

Author contributions: R.A.B, S.B.S, H.L.S and W.A.B. designed the study. S.B.S and H.L.S. carried out the samplings. R.A.B and S.B.S sequenced the individuals. R.A.B. conducted the data analysis and reconstructed the palaeochannels. R.A.B. and W.A.B. drafted the manuscript, which was approved by all the authors.

References

- Abreu, J.G.N & Calliari, L.J. (2005) Paleocanais na plataforma continental interna do Rio Grande Do Sul: Evidências de uma drenagem fluvial pretérita. *Revista Brasileira de Geofísica*, **23**, 123-132.
- Araújo, F.G. & Azevedo, M.C. (2001) Assemblages of Southeast-South Brazilian Coastal Systems Based on the Distribution of Fishes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **52**, 729–738.
- Araujo, S.B.L., Braga, M.P., Brooks, D.R., Agosta, S.J., Hoberg, E.P., Von Hartenthal, F.W. & Boeger, W.A. (2015) Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. *PLoS One*, **10**, e01339225.
- Albert, J.S. & Reis, R.E. (2011) *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*. University of California Press, Los Angeles, EUA.
- Barbieri, L.R.R., Andreato, V., Santos, M.A., Silva, M.H.C., Sebilha, A.S.C. & Santos, R.P. (1991) Distribuição e ciclo de vida das espécies de peixes mais abundantes da Laguna de Marapendi, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **7**, 223-243.
- Barreiros, J.P., Figna, V., Hostim-Silva, M. & Santos, R.S. (2004) Seasonal Changes in a Sandy Beach Fish Assemblage at Canto Grande, Santa Catarina, South Brazil. *Journal of Coastal Research*, **20**, 862-870.
- Bamber, R.N. & Henderson, P.A. (1988) Pre-adaptative plasticity in atherinids and the estuarine seat of teleost evolution. *Journal of Fish Biology*, **33**, 17-33.
- Bandelt, H-J., Forster, P. & Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology Evolution*, **16**, 37-48.
- Beerli P. (2008) Migrate version 3.0 - a maximum likelihood and Bayesian estimator of gene flow using the coalescent. Downloaded from <http://popgen.scs.edu/migrate.html>.
- Beheregaray, L.B., Sunnucks, P. & Briscoe, D.A. (2002) A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in Southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **269**, 65-73.
- Bemvenuti, M.A. (1987) Abundância, distribuição e reprodução de peixes-rei (Atherinidae) na região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. *Atlântica*, **9**, 5-32.
- Brooks, D.R. & McLennan, D.A. (2001) A comparison of a discovery-based and an event-based method of historical biogeography. *Journal of Biogeography*, **28**, 757–767.

Chakona, A., Swartz, E.R. & Gouws, G. (2013) Evolutionary Drivers of Diversification and Distribution of a Southern Temperate Stream Fish Assemblage: Testing the Role of Historical Isolation and Spatial Range Expansion. *Plos One*, **8**, e70953.

Conti, L.A. (2009) Evidências da evolução dos sistemas de paleodrenagens na plataforma continental da região de São Sebastião (litoral norte do estado de São Paulo). *Revista Brasileira de Geomorfologia*, **10**, 45–55.

Conti, L.A., & Furtado, V.V. (2009) Topographic register of paleo-valleys on the Southeastern Brazilian Continental Shelf. *Brazilian Journal of Oceanography* **57**, 113-121.

Correa, I.C.S. (1996) Les variations du niveau de la mer durant les derniers 17.500 ans BP: l'exemple de la plate-forme continentale du Rio Grande do Sul-Brésil. *Marine Geology*, **130**, 163-178.

De Bruyn, M. & Mather, P.B. (2007) Molecular signatures of Pleistocene sea-level changes that affected the connectivity among freshwater shrimp in indo-Australian waters. *Molecular ecology*, **16**, 4295-4307.

Dias, M.S., Oberdorff, T., Hugueny, B., Leprieur, F., Jézéquel, C., Cornu, J.F., Brosse, S., Grenouillet, G. & Tedesco, P.A. (2014) Global imprint of historical connectivity on freshwater fish biodiversity. *Ecology Letters*, **17**, 1130–1140.

Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1185-1192.

Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Rawlence, N. & Rambaut, A. (2007) A Rough Guide to BEAST 1.4. Downloaded from <http://tree.bio.ed.ac.uk/download.php?id=91&num=2>.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 1969-1973.

Erwin, T.L. (1979) Thoughts on the evolutionary history of ground beetles: hypotheses generated from comparative faunal analyses of lowland forest sites in temperate and tropical regions. *Carabid beetles – their evolution, natural history, and classification* (ed. by Erwin, T.L., Ball, G.E. & Whitehead, D.R.), pp. 539-592. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Erwin, T.L. (1981) Taxon pulses, vicariance, and dispersal: an evolutionary synthesis illustrated by carabid beetles. *Vicariance biogeography – a critique* (ed. by Nelson, G. & Rosen, D.E.). pp. 159-196. Columbia University Press, New York, EUA.

Erwin, T.L. (1985). The taxon pulse: a general pattern of lineage radiation and extinction among carabid beetles. *Taxonomy, Phylogeny and Biogeography of Beetles and Ants* (ed. by Ball, G.E). pp. 437-472. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource*, **10**, 564-567.

Fávaro, L.F., Lopes, S.C.G. & Spach, H.L. (2003) Reprodução do peixe-rei, *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinidae), em uma planície de maré adjacente à gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **20**, 501–506.

Figueiredo, J.L. & Menezes, N.A. (1978) *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II. Teleostei (1)*. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. (2004) *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Garcia, A.M., Vieira, J.P. & Winemiller, K.O. (2001) Dynamics of the shallow-water fish assemblage of the Patos Lagoon estuary (Brazil) during cold and warm ENSO episodes. *Journal of Fish Biology*, **59**, 1218–1238.

Gotoh, R.O., Chiba, S.N., Goto, T.V., Tamate, H.N. & Hanzawa, N. (2011) Population genetic structure of the stripes silverside *Atherinomorus endrachtensis* (Atherinidae, Atheriniformes, Teleostei), inhabiting marine lakes and adjacent lagoons in Palau: marine lakes are “Islands” for marine species. *Genes and Genetic Systems*, **86**, 325-337.

Guo, Y., Luo, Y., Liu, Z. & Wang, X. (2015) Reticulate evolution and sea-level fluctuations together drove species diversification of slipper orchids (*Paphiopedilum*) in South-East Asia. *Molecular Ecology*, **24**, 2838-2855.

Halas, D., Zamparo, D. & Brooks, D.R. (2005) A historical biogeographical protocol for studying biotic diversification by taxon pulses. *Journal of Biogeography*, **32**, 249-260.

Harris, L.N. & Taylor, E.B. (2009) Pleistocene glaciations and contemporary genetic diversity in a Beringian fish, the broad whitefish, *Coregonus nasus* (Pallas): inferences from microsatellite DNA variation. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**, 72-86.

Hostim-Silva, M., Clezar, L., Ribeiro, G.C. & Machado, C. (1995) Estrutura populacional de *Xenomelaniris brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes- Atherinidae) na Lagoa da Conceição, SC, Brasil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **38**, 949- 960.

- Kimura, M. (1953) "Stepping Stone" model of population. *Annual Report National Institute of Genetics*, **3**, 62-63.
- Knoppers, B., Ekau, W. & Figueiredo, A.G. (1999) The coast and shelf of east and northeast Brazil and material transport. *Geo-Mar Letters*, **19**, 171-178.
- Lieberman, B.S. (2000) *Paleobiogeography*. Plenum/Kluwer Academic, New York, EUA.
- Lieberman, B.S. (2003a) Unifying theory and methodology in biogeography. *Evolutionary Biology*, **33**, 1–25.
- Lieberman, B.S. (2003b) Paleobiogeography – the relevance of fossils to biogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **34**, 51–69.
- Meyer, A., Kocher, T.D., Basasibwaki, P. & Wilson, A.C. (1990) Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, **347**, 550-553.
- Neves, L.M., Pereira, H.H., Costa, M.R. & Araújo, F.G. (2006) Uso do manguezal de Guabatiba, Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, pelo peixe-rei *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **23**, 421–428.
- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *Molecular Systematics* (ed. by Moritz, C. & Mable, B.K.). Sinauer Associates, Sunderland, UK.
- Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, **20**, 289-290.
- Perdices, A. & Doadrio, I. (2001). The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **19**, 468–478.
- Pereira, T.L., Santos, U., Schaefer, C.E., Souza, G.O., Paiva, S.R., Malabarba, L.R., Schmidt, E.E. & Derga, J.A. (2013). Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *Journal of Biogeography*, **40**, 905–914.
- Pessanha, A.L.M. & Araújo, F.G. (2001) Recrutamento do peixe-rei, *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinopsidae), na margem continental da baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **18**, 1265-1274.
- Pil, M.W., Boeger, M.R.T., Muschner, V.C., Pie, M.R., Ostrensky, A. & Boeger, W. (2011) Postglacial north-south expansion of populations of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) along the Brazilian coast revealed by microsatellite analysis. *American Journal of Botany*, **98**, 1031-1039.

- Posada, D. (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253-1256.
- Prioli, S.M.A.P., Prioli, A.J., Júlio-Jr., H.F., Pavanelli, C.S., Oliveira, A.V., Carrer, H., Carraro, D.M. & Prioli, L.M. (2002) Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, **25**, 421-430.
- Santos-Filho, J.R. (2009). *Geomorfologia da plataforma continental do estado do Paraná e norte de Santa Catarina*. Monography. Universidade Federal do Paraná – Curitiba, Brazil.
- Seutin, G., White, B.N. & Boag, P.T. (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Canadian Journal of Zoology*, **69**, 82-90.
- Siddall, M., Rohling, E.J., Almogi-Labin, A., Hemleben, C., Meischner, D., Schmetzer, J. & Sneed, D.A. (2003) Sea-Level fluctuations during the last glacial cycle. *Nature*, **423**, 853-858.
- Souza-Bastos, L.R. & Freire, C.A. (2011). Osmoregulation of the resident estuarine fish *Atherinella brasiliensis* was still affected by an oil spill (Vicuña tanker, Paranaguá Bay, Brazil), 7 months after the accident. *Science of the Total Environment*, **409**, 1229-1234.
- Souza-Júnior, V.S., Vidal-Torrado, P., Tessler, M.G., Pessenda, L.C.R., Ferreira, T.O., Otero, X.L. & Macías, F. (2007) Evolução Quaternária, distribuição de partículas nos solos e ambientes de sedimentação em manguezais do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, **31**, 753-769.
- Suguio, K., Martin, L., Bittencourt, A.C.S.P., Dominguez, J.M.L., Flexor, J-M. & Azevedo, A.E.G. (1985) Flutuações no nível relativo do mar durante o Quaternário Superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira *Revista Brasileira de Geociências*, **15**, 273-286.
- Schultz, E.T. & McCormick, S.D. (2013) Euryhalinity in an Evolutionary Context. *Eurihaline Fishes* (ed. by McCormick, S.D., Farrell, A.P. & Brauner, C.J.). pp. 477-533. Elsevier, New York, EUA.
- Swartz, E.R., Skelton, P.H. & Bloomer, P. (2009) Phylogeny and biogeography of the genus *Pseudobarbus* (Cyprinidae): Shedding light on the drainage history of rivers associated with the Cape Floristic Region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **51**, 75-84.
- Thomaz, A.T., Malabarba, L.R., Bonatto, S.I. & Knowles, L.L. (2015) Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, **42**, 2389-2401.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673–4680.
- Unmack, P.J., Hammer, M.P., Adams, M. & Johnson, J.B. (2013) The role of continental shelf width in determining freshwater phylogeographic patterns in south-eastern Australian pygmy perches (Teleostei: Percichthyidae). *Molecular Ecology*, **22**, 1683–1699.
- Vendel, AL. & Chaves, P.T. (2006) Use of an estuarine environment (Barra do Saí lagoon, Brazil) as nursery by fish. *Revista Brasileira de Zoologia*, **23**, 1117–1122.
- Vital, H., Gomes, M.P., Tabosa, W.F., Frazão, E.P., Santos, C.L.A., & Plácido Jr., J.S. (2010) Characterization of the Brazilian continental shelf adjacent to Rio Grande do Norte state, NE Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, **58**, 43-54.
- Vital, H., Esteves, L., Araujo, T.C.M. & Patchneelam, S. (2005) Oceanografia geologica e geofisica da plataforma continental brasileira. *O Quaternário do Brasil* (ed. by Souza, C.R.G., Suguio, K., Oliveira, A.M.S. & Oliveira P.E). pp. 153-175. Holos Editora, Ribeirão Preto, Brazil.
- Weitzman, S.H., Menezes, N.A. & Weitzman, M.J. (1988) Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (ed. by Vanzolini, P.E. & Heyer, W.R) pp. 379-427. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Brazil.
- Weschenfelder, J., Correa, I.C.S., Aliotta, S. & Baitelli, R. (2010). Paleochannels related to late Quaternary sea-level changes in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, **58**, 35-44.

CAPÍTULO II

Avaliação do comportamento de *homing* de grandes bagres do Alto Paraná: uma nova abordagem

Rafael A. Baggio^{1,2,3}, Caroline B. Moretti^{1,2}, Andréa Bialezki⁴, Megan J. Osborne⁵,

Thomas F. Turner⁵, Walter A. Boeger^{1,2,3}

¹ Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim, Curitiba, Paraná, Brazil. CEP 81531-970.

² Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim, Curitiba, Paraná, Brazil. CEP 81531-970.

³ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim, Curitiba, Paraná, Brazil. CEP 81531-970.

⁴ Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), Universidade Estadual de Maringá (UEM). Avenida Colombo 5790, Maringá, Paraná, Brazil. CEP 87020-900.

⁵ Department of Biology and Museum of Southwestern Biology, University of New Mexico. The University of New Mexico Albuquerque, NM 87131, Albuquerque, New Mexico, United States.

Autor correspondente: Rafael A. Baggio. rbaggio@ufpr.br / rbaggioufpr@gmail.com. Laboratório de Ecologia Molecular, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim das Américas, CEP 81531-980, Caixa Postal 19073, Curitiba, Paraná, Brazil. +55 41 33611765.

- Artigo formatado para ser publicado na revista *Fish and Fisheries*.

Resumo

A alta quantidade de barragens tem grandes implicações para peixes migradores neotropicais (e.g. grandes bagres), em especial para espécies que realizam *homing*. *Homing* é o comportamento no qual os indivíduos retornam ao seu sítio reprodutivo natal para reprodução em detrimento a outros igualmente prováveis e foi sugerido para algumas espécies de Pimelodidae. Nesse trabalho, é proposta uma nova abordagem para testar a hipótese do comportamento de *homing*, a qual é aplicada para o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, da bacia do Alto Rio Paraná. Para isso, marcadores moleculares de alta resolução foram aplicados em adultos (populações nas áreas de alimentação) e em larvas (populações que se reproduzem em cada área de reprodução) das regiões baixas dos tributários da bacia do Alto Rio Paraná. Um total de 171 larvas de *P. corruscans* foi coletado provenientes principalmente dos Rios Ivinheima, Ivaí e Amambai. As análises genéticas demonstram que as populações dos Rios Ivinheima e Ivaí são semelhantes entre si, e diferentes da população do Rio Amambai. Por outro lado, as populações de adultos coletados nos mesmos locais (75 indivíduos) não foram geneticamente diferentes entre si e representaram mistura de indivíduos entre os 2 agrupamentos. Diferenciação genética entre as populações de larvas e mistura entre populações na área de alimentação são esperadas para populações que realizam *homing*, e sugere que o pintado do Alto Rio Paraná realiza esse comportamento. Contudo, a ausência de diferenciação genética entre as populações dos Rios Ivinheima e Ivaí indica que outros mecanismos podem estar envolvidos, tal como a influência da UHE de Porto Primavera, à montante. A metodologia utilizada se apresentou bastante promissora e pode ser utilizada para outras espécies e em outras regiões, de forma a guiar estratégias de manutenção, manejo e mitigação do impacto ambiental de empreendimentos de geração de energia sobre espécies de peixes neotropicais.

Palavras-chaves: Conservação, Larvas de peixes, Marcadores moleculares, Migração, *Pseudoplatystoma corruscans*, Represas.

Introdução

Os rios neotropicais estão entre os ecossistemas mais diversos do mundo, contendo mais de 6000 espécies de peixes (Vari e Malabarba 1998, Reis *et al.* 2003, Albert *et al.* 2011). Juntamente com Characiformes, as espécies da ordem Siluriformes possuem destacada abundância nessa região, com marcada importância econômica e ecológica, sendo consideradas chaves para o ecossistema devido ao seu comportamento predatório (Carolsfeld *et al.* 2003). Tais espécies, ainda, possuem características biológicas complexas, envolvendo as maiores migrações conhecidas para peixes em água doce no mundo (e.g. *Brachyplatystoma rousseauxii*, Batista e Alves-Gomes 2006).

Movimentos migratórios permitem posicionar os peixes diretamente nos habitats com melhores condições ambientais, maximizando a sobrevivência, a dispersão geográfica e a abundância das populações (Barthem e Goulding 1997). Esse comportamento, entretanto, torna peixes migradores mais vulneráveis à fragmentação ambiental decorrentes da construção de Usinas Hidrelétricas e de seus reservatórios. Populações panmíticas, como a dourada *B. rousseauxii* (Batista e Alves-Gomes 2006, Batista 2010, Carvajal-Vallejos *et al.* 2014) e a piramutaba *B. vaillantii* (Formiga-Aquino 2004, Rodrigues 2009) da bacia e sub-bacias do Rio Amazonas, seriam particularmente susceptíveis a esses empreendimentos.

A fragmentação ambiental das bacias hidrográficas é, possivelmente, ainda mais impactante sobre populações de peixes que realizam *homing*, comportamento de retorno dos indivíduos ao seu sítio reprodutivo natal para reprodução em detrimento a outros igualmente prováveis (Gerking 1959). Esse fenômeno parece ser comum em grandes bagres Pimelodidae (Carolsfeld *et al.* 2003). Godinho *et al.* (2007) descreveram o contínuo retorno de fêmeas de *Pseudoplatystoma corruscans* marcadas com radiotelemetria ao mesmo sítio de reprodução (corredeiras de Pirapora no Rio São Francisco), dentro de um mesmo período reprodutivo, como indicativos de *homing* para a espécie. Utilizando marcadores microsatélites, Pereira *et al.* (2009) e Abreu *et al.* (2009) encontraram 6 populações geneticamente distintas de *P. corruscans* da bacia do Paraná-Paraguai, e significativa diferenciação genética entre duas populações do cachara, *P. reticulatum*, do Alto Rio Paraguai, respectivamente. Ambos foram interpretados como indicativos do comportamento de *homing* para as espécies. Alternativamente, Prado (2014) encontrou diferenciação fraca ou ausente entre populações de *P. corruscans* das bacias dos Rios Paraná e Paraguai. Contudo, em nenhum desses estudos foram realizados testes com metodologias específicas para testar a hipótese de *homing*. Um teste dessa hipótese para peixes necessita de uma análise por dados moleculares de grande resolução, um desenho experimental específico à hipótese e análises

detalhadas de genética de populações, permitindo assim uma avaliação de parâmetros populacionais influenciados por eventos recentes.

Marcadores microssatélites são ferramentas úteis para testar a hipótese de *homing* pois permitem a avaliação da estrutura genética de populações e a identificação da procedência de indivíduos de origem desconhecida (sítio de reprodução). Além disso, esses marcadores permitem o desenvolvimento de novas estratégias de amostragem e teste de hipóteses de migração de peixes utilizando larvas como indicadoras de eventos populacionais, resultando em estudos menos complexos e custosos. Nesse estudo, portanto, é proposta uma nova abordagem para teste da hipótese de *homing* em peixes, a qual envolve a utilização de suas larvas.

A bacia do Alto Rio Paraná compreende o primeiro terço da bacia do Rio Paraná e 10% do território brasileiro, e possui aproximadamente 310 espécies de peixes (Langeani *et al.* 2007). Essa região é especialmente interessante para o teste de *homing* de bagres pois é altamente impactada pelas atividades humanas, devido à poluição, às atividades de agricultura e pecuária, e pela presença de diversos barramentos (Agostinho *et al.* 2007). Dessa forma, compreender as características biológicas de suas espécies é fundamental para a definição de estratégias de manutenção e manejo das populações de peixes e de sua diversidade genética. Na bacia do Alto Rio Paraná, os peixes migradores geralmente desovam em grandes tributários, se desenvolvem em lagoas nas partes baixas desses rios ou em bancos e ilhas da calha principal, sendo os sítios de alimentação em reservatórios, tributários ou no próprio Rio Paraná (Petrere-Jr. *et al.* 2002, Agostinho *et al.* 2003, Baumgartner *et al.* 2004, Barzotto *et al.* 2015).

O pintado, *P. corruscans*, destaca-se entre as espécies presentes na região por representar o maior bagre da bacia e uma das espécies mais exploradas (Petrere-Jr *et al.* 2002). Contudo, devido a rápidas e drásticas alterações ambientais ocorridas na bacia do Alto Paraná e à sobre-exploração, essa espécie tem sofrido extensa redução em seu estoque natural (Petrere-Jr *et al.* 2002, Agostinho *et al.* 2003, 2008), com alto risco de extinção local, como já ocorreu em trechos superiores da bacia (Prioli *et al.* 2003). O comportamento de *homing* tem sido proposto para essa espécie em diferentes sistemas (bacia do Rio São Francisco, bacia do Paraná) com diferentes marcadores (marcadores microssatélites, radiotelemetria). Como para todas as espécies neotropicais, testar a existência do comportamento de *homing* de *P. corruscans* é fundamental para balizar planejamentos estratégicos que visem a sustentabilidade dos estoques naturais. Esse conhecimento pode orientar medidas mitigatórias cientificamente embasadas em resposta a barramentos.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar uma proposta metodológica para testar hipóteses de *homing* em peixes de água doce de maneira empírica, utilizando como modelo o pintado *P. corruscans* da bacia do Alto Rio Paraná. A proposta metodológica é descrita na seção seguinte e inclui a identificação molecular e a genotipagem de larvas dessa espécie, provenientes das áreas de reprodução (tributários), e adultos, da área de alimentação (regiões baixas dos tributários e calha principal do Rio Paraná).

Materiais e Métodos

Metodologia para teste de comportamento de homing

Em espécies que realizam *homing*, espera-se que cada conjunto de indivíduos que se reproduz em cada área de desova componha uma população distinta daquelas de outros conjuntos semelhantes. Dessa forma, espera-se encontrar diferenciação genética entre as populações (*demes*) que se reproduzem em cada sítio de reprodução (i.e. corredeiras nos tributários), devido aos efeitos de deriva genética e adaptação local (Hansen *et al.* 2002, 2007), com mistura das populações nas áreas de alimentação (i.e. partes baixas dos tributários e calha principal da bacia), gerando um padrão dendrítico de estrutura genética (Bouza *et al.* 1999, Primmer *et al.* 2006, Wollebæk *et al.* 2011, Östergren *et al.* 2012, Junge *et al.* 2014). Por serem carregadas passivamente pelo fluxo unidirecional da água, é possível utilizar larvas coletadas na desembocadura dos rios para representar a diversidade genética dos indivíduos que efetivamente se reproduzem nas áreas de desova dos tributários. Essa metodologia diminui os custos de viagens até as áreas de desova para coleta de adultos que se reproduzem nelas, ou de metodologias tradicionalmente utilizadas para testar o *homing* em espécies de peixes (e.g. radiotelemetria). Uma vez que a identificação de larvas baseada em caracteres morfológicos é frequentemente difícil (Nakatani *et al.* 2001), as larvas podem ser identificadas através do método de código de barras de DNA (*DNA barcode*, Hebert *et al.* 2003), com posterior genotipagem com marcadores moleculares de alta resolução (e.g. marcadores microssatélites) para o teste de *homing*. Com base nisso, a presença de diferenciação genética entre as populações dos tributários (larvas) com mistura de populações (adultos) na calha principal do Rio Paraná suporta a hipótese de *homing* para a espécie (Fig. 1a). Em contrapartida, caso as populações dos tributários sejam uma amostragem aleatória das populações de adultos das áreas de alimentação, a hipótese deve ser rejeitada (Fig. 1b).

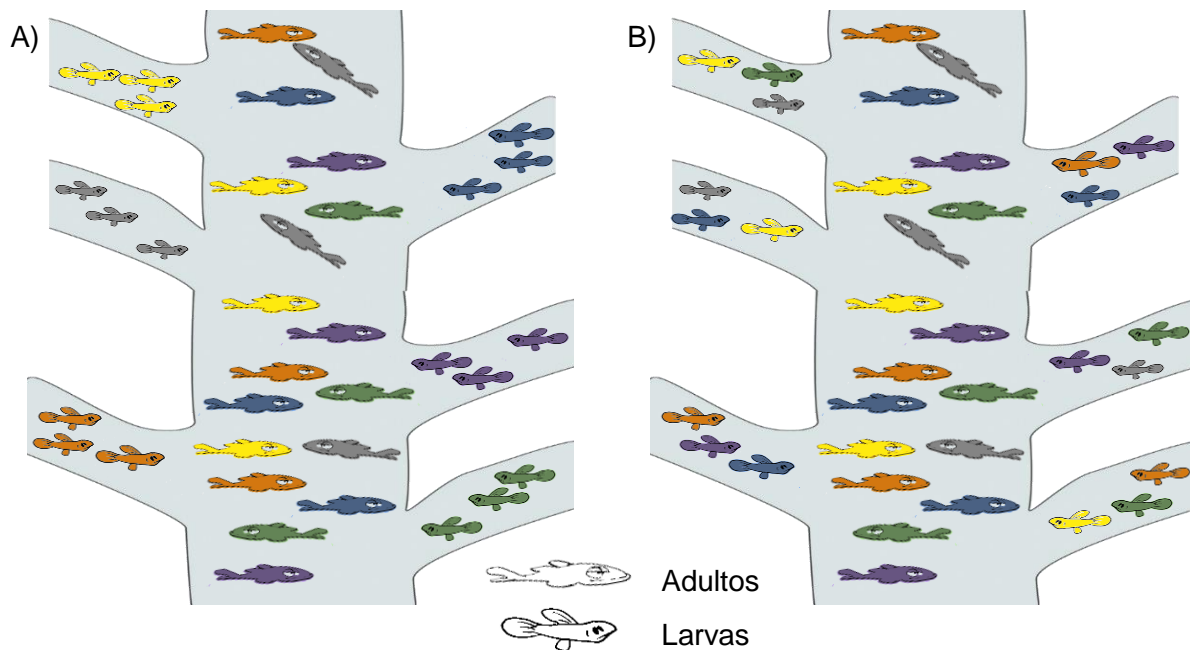


Figura 1. Previsões esperadas para existência (a) ou não (b) do comportamento de *homing* para uma espécie hipotética. No primeiro (a), as populações de larvas seriam diferentes geneticamente entre os tributários com mistura das populações nos sítios de alimentação (calha principal). Alternativamente (b), as populações dos tributários seriam amostragens aleatórias da população da calha principal. Cada cor representa uma população hipotética.

Coleta de material biológico

Para coleta de larvas de *P. corruscans*, amostras de ictioplâncton foram coletadas em campanhas entre fevereiro/2012 e outubro/2015 ao longo da calha principal do Rio Paraná, entre a UHE de Porto Primavera (montante) e o reservatório de Itaipu (jusante), e nas partes baixas dos principais tributários: Rios Ivinheima, Ivinheiminha, Piquiri, Amambaí, Ivaí e Iguatemi (Fig. 2, Tab. 1). Em cada tributário, entre 20 e 30 amostras foram coletadas em cada uma das 5 a 20 noites de coleta (5 noites no Rio Ivaí, 6 nos Rios Iguatemi e Piquiri, 7 no Rio Amambai, e 20 no Rio Ivinheima). As coletas passivas de ictioplâncton foram realizadas em redes cônico-cilíndrica com malha 500 μm e 1,5 m de comprimento por 10 minutos, e as amostras foram conservadas em álcool 70%. Adultos foram coletados nos mesmos pontos em fevereiro de 2014, representando as populações presentes nas áreas de alimentação.

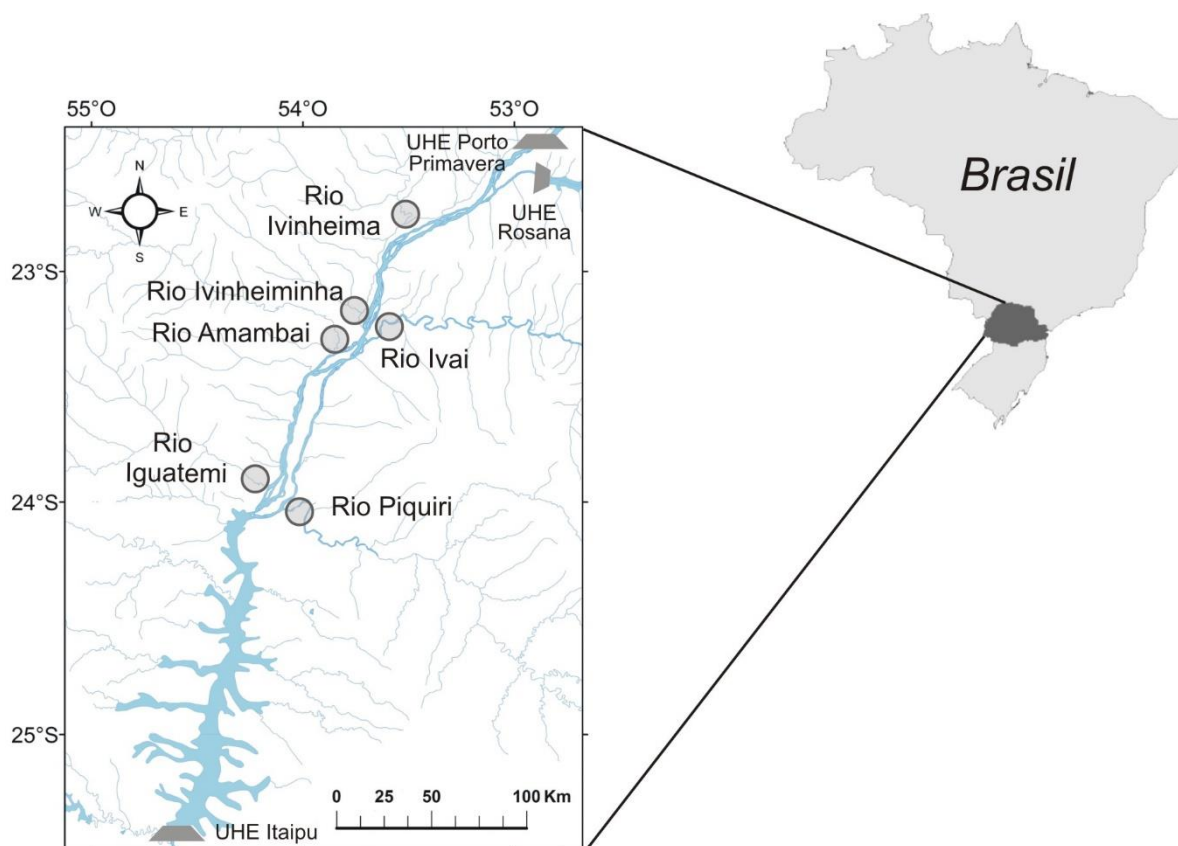


Figura 2. Pontos de coletas de larvas e adultos nos tributários na bacia do Alto Rio Paraná, entre o reservatório de Itaipu e a UHE de Porto Primavera.

Identificação, genotipagem e sequenciamento de larvas e adultos

As larvas coletadas foram identificadas morfológicamente até o menor nível taxonômico possível. As larvas com morfologia compatível a *P. corruscans* tiveram seu DNA total extraído através do kit DNeasy (Qiagen) e sua identificação molecular foi realizada através do método de código de barras de DNA (*DNA barcode*, Hebert *et al.* 2003) na ferramenta online BoldSystems v3 (Ratnasingham e Hebert 2007). A amplificação do fragmento COI foi realizada em reações de PCR de 25 μ l com 25x buffer, 3 mM de MgCl₂, 0,4 μ M de dNTP, 1 pmol de cada iniciador (FF2d e FR1d, Ivanova *et al.* 2007) e 20 - 40 ng de DNA. O programa de PCR incluiu um ciclo de denaturação inicial a 94° C por 4 min, 35 ciclos a 94° C por 4 min para denaturação, anelamento a 58° C por 45 s e extensão a 72° C por 1 min, e um ciclo de 72° C por 5 min para extensão final. As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit BigDye® (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante, purificadas usando o kit Sephadex G-50 (GE) e sequenciadas em um sequenciador ABi 3130 (Applied Biosystems).

Tabela 1. Locais de coletas de larvas e adultos de *P. corruscans* da bacia do Alto Rio Paraná.

Local	Coordenada
Rio Ivinheima	22°48'00"S / 53°32'00"O
	22°47'42"S / 53°32'42"O
	22°47'40"S / 53°32'14"O
	22°50'60"S / 53°34'30"O
	22°49'22"S / 53°33'10"O
	22°55'54"S / 53°39'11"O
	22°56'46"S / 53°38'33"O
	23°14'00"S / 53°43'24"O
Rio Ivinheiminha	22°59'12"S / 53°38'56"O
Rio Amambai	23°20'20"S / 53°51'24"O
	23°21'28"S / 53°53'04"O
	23°20'20"S / 53°51'29"O
Rio Ivaí	23°15'01"S / 53°38'18"O
	23°16'20"S / 53°37'58"O
	23°17'17"S / 53°39'42"O
	23°18'00"S / 53°41'32"O
	23°15'05"S / 53°37'58"O
Rio Iguatemi	23°55'38"S / 54°11'22"O
	23°55'37"S / 54°10'45"O
	23°55'27"S / 54°11'24"O
	23°55'21"S / 54°11'15"O
	23°55'38"S / 54°11'22"O
	23°55'29"S / 54°11'39"O
Rio Piquiri	24°01'47"S / 54°02'53"O
	24°01'52"S / 54°04'33"O
	24°01'51"S / 54°02'48"O
Rio Paraná	23°40'18"S / 54°03'47"O
	23°26'09"S / 53°58'00"O
	23°38'51"S / 53°56'44"O
	22°39'02"S / 53°05'26"O
	22°45'39"S / 53°19'41"O
	23°14'18"S / 53°43'04"O
	22°53'41"S / 53°38'41"O
	23°21'52"S / 53°52'48"O
	23°55'28"S / 54°09'17"O
	23°18'12"S / 53°41'54"O
	24°01'24"S / 54°05'33"O
	23°38'51"S / 53°56'44"O
	24°01'06"S / 54°10'10"O
	24°00'58"S / 54°10'37"O
23°48'50"S / 53°59'53"O	

Os adultos, extraídos com o kit EZ DNA (Biological Industries), e as larvas identificadas molecularmente como *P. corruscans* foram genotipadas para 9 loci de marcadores microssatélites (Pcor01, Pcor02, Pcor05, Pcor07, Pcor08, Pcor10, Pcor21, Pcor23 e Pcor28, Revaldaves *et al.* 2005, Pereira *et al.* 2009). As reações de PCR com 10ul continham 10x buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,05 pmol de cada iniciador, 0,3 U de Taq e 5 ng de DNA. As condições do PCR compunham um ciclo de 95° C por 3 min, 35 ciclos a 95° C por 30 segundos para denaturação, 55° C (50° C para o Pcor10) de anelamento por 1 min e 1 min de extensão a 72° C, seguido por um ciclo de 1h a 72° C para extensão final. A genotipagem foi realizada em um sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems). Os dados dos marcadores microssatélites foram utilizados para testar a presença de larvas e adultos híbridos com *P. reticulatum* (ver Baggio *et al.*, Cap. III para protocolos e resultados) e para o teste de *homing* de *P. corruscans*.

Sequências com 300 pb da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) foram amplificadas para larvas e adultos pela técnica de polimorfismo de conformação de fita simples - SSCP (Sunnucks *et al.* 2000). Para isso, iniciadores senso (Pcor_Dloop_F - 5'CCC ACA TTA TGT ATT CCT GTA TGG TAT AGT 3') e antissenso (Pcor_Dloop_R - 5'GAT TGG TCG GTT CTT ACT GGG TA 3') foram desenvolvidos, sendo o primeiro marcado radioativamente. A marcação com γ -33P foi realizada em uma reação de 19 ul com 1,6 ul do primer senso (10uM), 1 U de T4 Polynucleotide Kinase (Bioline), 4 ul de T4 Polynucleotide Kinase buffer (Bioline) e 0,12 mM [γ -33P]ATP (sp. act. 3000 Ci/mmole; 10 uCi/uL), à 37° C por 30 minutos, seguido por 2 minutos a 95° C. As reações para amplificação do DNA de 10 ul continham como concentrações finais de 10x buffer, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,35 pM do primer senso marcado, 1,5 pM do primer senso não marcado, 5 pM do primer antissenso, 0,0375 U de Taq e 5,0 ng μ l⁻¹ de DNA. As condições de PCR possuíam um ciclo de desnaturação inicial de 94° C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação de 94° C por 30 segundos, 66° C (reduzido em 0,2° C por ciclo) de anelamento por 30 segundos e 72° C para extensão por 45 segundos, finalizado por 1 ciclo de 72° C por 5 minutos. Quando completas, as reações foram diluídas em 10 ul de solução carregadora (1x TE, glycerol e bromophenol). As amostras foram então denaturadas a 95° C por 5 minutos. A variação das sequências de nucleotídeos entre indivíduos foi avaliada em eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-denaturante, em corrida a 400 V por 18 horas e visualizada em autorradiografia. Aproximadamente 20% das amostras e aquelas com resultado negativo para o SSCP foram sequenciadas em sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems). Para isso, o PCR de 25 ul foi realizado com as mesmas condições, iniciadores e concentrações da reação de SSCP (exceto pela utilização apenas do primer senso não marcado), sendo seu produto purificado com o kit EZNA Cycle Pure (Omega). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando os mesmos

iniciadores da amplificação do PCR e o kit BigDye v3.1 (Applied Biosystems) segundo protocolo do fabricante. A sua purificação foi realizada através de precipitação com isopropanol e sequenciamento em um sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

Análises genéticas

Avaliação da presença de alelos nulos e erros de amplificação e de definição dos alelos foi realizada através do software Micro-Checker 2.2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004), e as análises de diversidade genética (número de alelos, diversidade genotípica), desequilíbrio de ligação, equilíbrio de Hardy-Weinberg e estruturação genética (Fst, Rst e AMOVA) foram realizadas no software Arlequin 3.5 (Excofier e Lischer 2010). Sempre que múltiplas comparações foram realizadas, o valor crítico de p foi corrigido pelo método B-Y (Narum, 2006). Os tamanhos efetivos populacionais baseados no desequilíbrio de ligação foram estimados com o software LDNe 1.31 (Waples e Do, 2008), e a hipótese de diminuição recente no tamanho efetivo populacional foi testado no programa Bottleneck 1.2.02 (Piry *et al.* 1999), através do modelo de evolução de 2 fases (T.P.M) e teste de Wilcoxon (Luikart *et al.* 1997). Uma rede de haplótipos para os dados de D-loop foi construída através do software Network 5.0.0.0 (Bandelt *et al.* 1999).

A determinação do número de populações reais e a alocação dos indivíduos em seus respectivos agrupamentos foram realizadas através do programa Structure 2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000) em 5 corridas independentes com 5 milhões de replicatas (500 mil de *burn-in*), com K variando entre 1 e 7. O método *ad hoc* desenvolvido por Evanno *et al.* (2005), implementado na ferramenta online Structure Harvester (Earl e vonHoldt 2012), foi utilizado para definir o provável número de populações na amostra.

Resultados

Um total de 171 larvas e 75 adultos de *P. corruscans* foram coletados, sem sinais de hibridização com *P. reticulaum* (ver Baggio *et al.*, Cap. III). Dentre as larvas, 47 foram provenientes do Rio Ivinheima, 57 do Rio Ivaí, 62 do Rio Amambai, 2 do Rio Ivinheiminha e 3 da calha principal do Rio Paraná, sendo que nos três primeiros tributários foram coletadas larvas em mais de um período reprodutivo (Tab. 2). Nenhuma larva de *P. corruscans* foi coletada nos rios Iguatemi e Piquiri. Todas as larvas estavam nos estágios pré-flexão e flexão segundo Nakatani *et al.* (2001).

Tabela 2. Número total (Nt) e número por período reprodutivo (N₁: 2012-2013, N₂: 2013-2014, N₃: 2014-2015, N₄: 2015-2016 – valores em branco representam estações não amostradas) de adultos e larvas, identificadas morfológicamente e molecularmente, de *P. corruscans*; número de indivíduos sequenciados (N_s) e genotipados (N_g) e resultados das análises de diversidade (k: número de haplótipos; S: número de sítios polimórficos; π: diversidade nucleotídica; H: diversidade genotípica; número de alelos de cada *locus*; média de alelos por população). Números em negrito significam desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nenhuma larva foi coletada nos Rios Piquiri e Iguatemi.

Estágio	População	N _t	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	D-loop				Microssatélites													
							N _s	k	S	π	N _g	H	Fis	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor07	Pcor08	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28	Média	
Adultos	Ivinheima	26		26			25	5	6	0,006	26	0,62	-0,01	4	10	6	2	4	14	11	11	4	7,3 ± 4,2	
	Amambai	26		26			26	4	4	0,005	26	0,60	0,03	6	10	9	2	3	12	11	11	4	7,6 ± 3,8	
	Ivaí	5		5			5	2	3	0,005	5	0,60	0,08	3	4	6	1	3	4	6	6	2	4,2 ± 1,6	
	Piquiri	8		8			8	3	3	0,006	8	0,63	0,08	4	5	7	1	3	8	9	9	3	6,0 ± 2,6	
	Iguatemi	10		10			10	2	3	0,005	10	0,60	0,03	4	7	7	2	1	10	7	7	4	6,0 ± 2,5	
	Adultos	75		75			74	6	7	0,006	75	0,61	0,02	6	11	11	2	5	19	15	15	4	9,8 ± 5,8	
Larvas	Ivinheima	47	24	23			42	7	8	0,006	47	0,60	0,03	5	9	10	3	3	17	14	13	5	8,8 ± 5,1	
	Ivinheiminha	2		2			2	2	2	0,009	2	0,61	-0,14	3	4	4	1	1	4	3	3	1	3,5 ± 0,6	
	Amambai	62		53		9	58	2	2	0,004	62	0,61	-0,09	6	9	9	2	4	16	14	15	4	8,8 ± 5,2	
	Ivaí	57		9	48		45	3	3	0,005	57	0,58	0,01	8	8	9	2	5	17	15	15	5	9,4 ± 5,4	
	Paraná	3		3			3	1	0	0	3	0,69	0,05	2	4	2	2	1	5	3	4	2	3,0 ± 1,2	
	Piquiri	0		0	0		0				0													
	Iguatemi	0		0	0		0				0													
Larvas	171	24	90	48		150	7	9	0,005	171	0,61	-0,01	8	12	12	3	6	25	18	19	5	12,0 ± 7,4		
Total	246	24	165	48	9	224	9	11	0,005	246	0,61	0,00	9	12	14	3	7	26	20	20	5	12,9 ± 7,8		

A presença de alelos nulos e erros na amplificação e determinação dos alelos, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação não foram recorrentes para os diferentes *loci* nas diferentes populações de *P. corruscans*. Os valores médios de alelos foram de 9,8 e 11,7 alelos por *locus* e de diversidade genotípica de 0,61 e 0,60 para adultos e larvas, respectivamente. Dentre as populações de larvas com maiores números de indivíduos coletados ($n > 20$, Rios Ivinheima, Amambaí e Ivaí), esses valores variaram entre 8,8 e 9,4 e 0,58 e 0,61, respectivamente. Nenhuma população apresentou sinais de endocruzamento (Tab. 2).

As análises de tamanho efetivo populacional baseada no desequilíbrio de ligação dos *loci* (Waples e Do 2008) das principais populações amostradas indicaram baixos tamanhos efetivos populacionais, sendo o menor valor para larvas provenientes do Rio Amambaí (14,5, 95% IC: 12,4 – 17,0), seguida pela população de larvas do Rio Ivaí (35,7, 95% IC: 28,4 – 45,9), de adultos (50,6, 95% IC: 41,0 – 64,1), enquanto a população de larvas do Rio Ivinheima apresentou maior tamanho efetivo populacional (58,5%, 95% IC: 43,2 – 85,4). Não foram encontrados sinais de diminuição do tamanho efetivo populacional recente nas amostras ($p > 0,05$ para excesso de heterozigotos para todas as populações).

A amostra do Rio Ivinheima, única com número suficiente de larvas para análise temporal ($n > 20$ por período reprodutivo), não apresentou diferenciação entre as larvas coletadas nos dois períodos reprodutivos amostrados ($F_{st} = 0,00$, $p = 0,35$, e $R_{st} = 0,00$, $p = 0,84$ para marcadores microssatélites, $F_{st} = 0,00$, $p = 0,87$ para D-loop).

As análises de diferenciação genética entre as populações de adultos indicaram ausência de diferenciação genética entre as populações de adultos coletados dos distintos pontos amostrais. As análises de AMOVA, realizadas com populações com número amostral maior ou igual a 9 (Rios Ivinheima, Amambaí e Iguatemi), apresentaram 0,0% do total da variação decorrente da variação entre as populações ($p = 1,00$) para os marcadores microssatélites e 3,0% ($p = 0,178$) para o marcador mitocondrial. Os valores de F_{st} e R_{st} global corroboram a não estruturação das subpopulações de adultos ($F_{st} = 0,00$, $p = 1,00$, e $R_{st} = 0,00$, $p = 1,00$, para os marcadores microssatélites; $F_{st} = 0,03$, $p = 0,18$ para o D-loop), assim como os valores de F_{st} pareados entre cada população (Tab. 3).

As análises de estruturação genética entre as larvas suportam a diferenciação genética entre as populações de larvas amostradas nos principais tributários amostrados (i.e. Ivinheima, Ivaí e Amambaí), sendo que 2,2% (AMOVA baseada em F_{st} , $p = 0,00$) e 6,4% (AMOVA, $p = 0,01$) da variação dos dados são decorrentes da variação entre populações para os marcadores microssatélites e para o D-loop, respectivamente, exceto na análise de AMOVA baseada em R_{st} (1,4%, $p = 0,07$). Os valores globais de F_{st} foram de 0,02 ($p = 0,00$)

e 0,06 ($p = 0,01$) para marcadores microssatélites e D-loop, respectivamente, e de Rst foi de 0,01 ($p = 0,07$). As comparações pareadas baseadas em ambos os marcadores suportam a diferenciação genética entre a população de larvas provenientes do Rio Amambai e aquelas dos Rios Ivinheima e Ivaí, mas não suportam a diferenciação genética entre as duas últimas populações (Tab. 4).

Tabela 3. Valores de diferenciação genética (Fst, abaixo da diagonal, Rst, sobre a diagonal) para os marcadores microssatélites e mitocondrial D-loop (Fst) entre as populações de adultos *P. corruscans* coletados no Alto Rio Paraná. Nenhum valor foi significativo.

População	Microssatélites					D-loop				
	Ivinheima	Amambai	Ivaí	Piquiri	Iguatemi	Ivinheima	Amambai	Ivaí	Piquiri	Iguatemi
Ivinheima	-	0,00	0,04	0,00	0,00	-				
Amambai	0,00	-	0,07	0,00	0,00	0,00	-			
Ivaí	0,00	0,00	-	0,07	0,00	0,07	0,00	-		
Piquiri	0,00	0,00	0,00	-		0,00	0,00	0,02	-	
Iguatemi	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,12	0,03	0,00	0,08	-

Tabela 4. Valores de diferenciação genética (Fst, abaixo da diagonal, e Rst, sobre a diagonal) para os marcadores microssatélites e mitocondrial D-loop (Fst) entre as populações de larvas *P. corruscans* coletados no Alto Rio Paraná. Valores em negrito são significativos.

População	Microssatélites			D-loop		
	Ivinheima	Amambai	Ivaí	Ivinheima	Amambai	Ivaí
Ivinheima	-	0,03	0,00	-		
Amambai	0,04	-	0,01	0,12	-	
Ivaí	0,00	0,03	-	0,00	0,06	-

As análises bayesianas de alocação dos indivíduos e a análise *ad hoc* descrita por Evanno *et al.* (2005) indicam que o número de agrupamentos (K) mais provável para os dados genotípicos é 2. Essas análises suportam a distinção genética entre as larvas provenientes dos Rios Ivaí e Ivinheima com as larvas provenientes do Rio Amambai, com mistura de populações entre os adultos, apesar da predominância do primeiro grupo (Fig. 3).

Os números de haplótipos de larvas e adultos de *P. corruscans* foram semelhantes (7 e 6, respectivamente), havendo 3 haplótipos encontrados exclusivamente em larvas e 2 em adultos, todos em baixa frequência, suportando que as amostras de larvas e adultos compõem o mesmo *pool* genético (Tab.2, Fig. 4). A rede de haplótipos suporta que a diferença genética entre as larvas dos Rios Ivaí e Ivinheima com o Rio Amambai é decorrente de diferenças nas frequências dos principais haplótipos entre as populações, e não decorrente de uma presença extensiva de haplótipos exclusivos a uma população ou agrupamento.

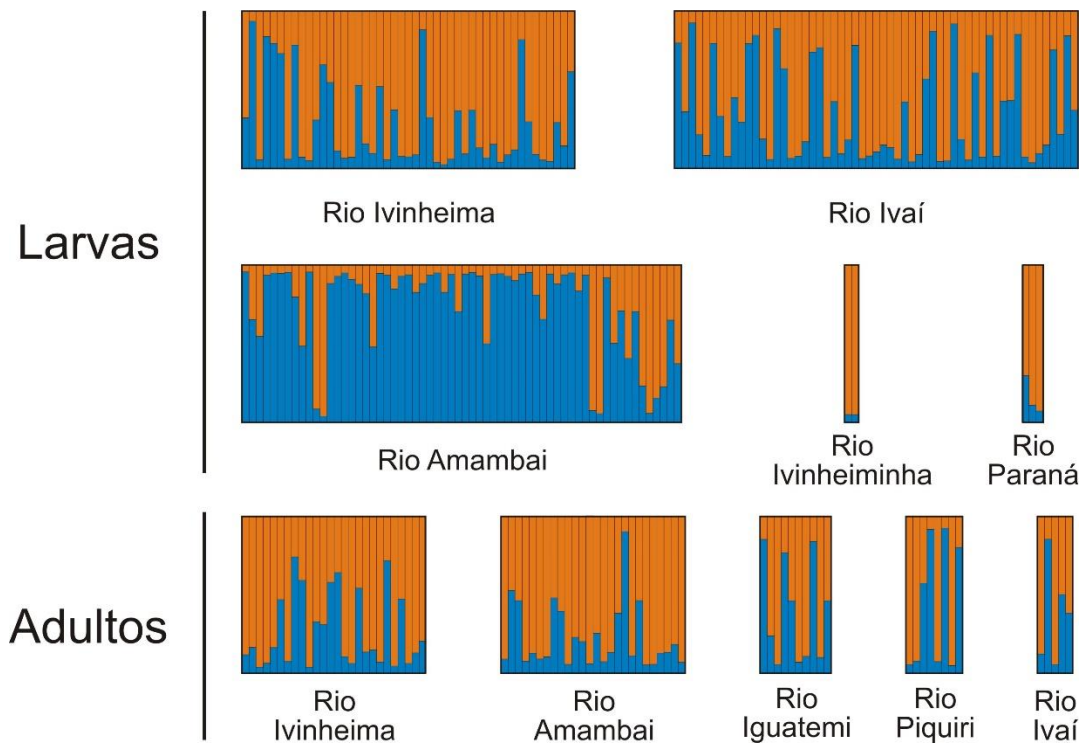


Figura 3. Alocação das larvas e adultos de *P. corruscans* do Alto Rio Paraná em seus respectivos agrupamentos. Cada coluna representa um indivíduo e cada cor representa um agrupamento.

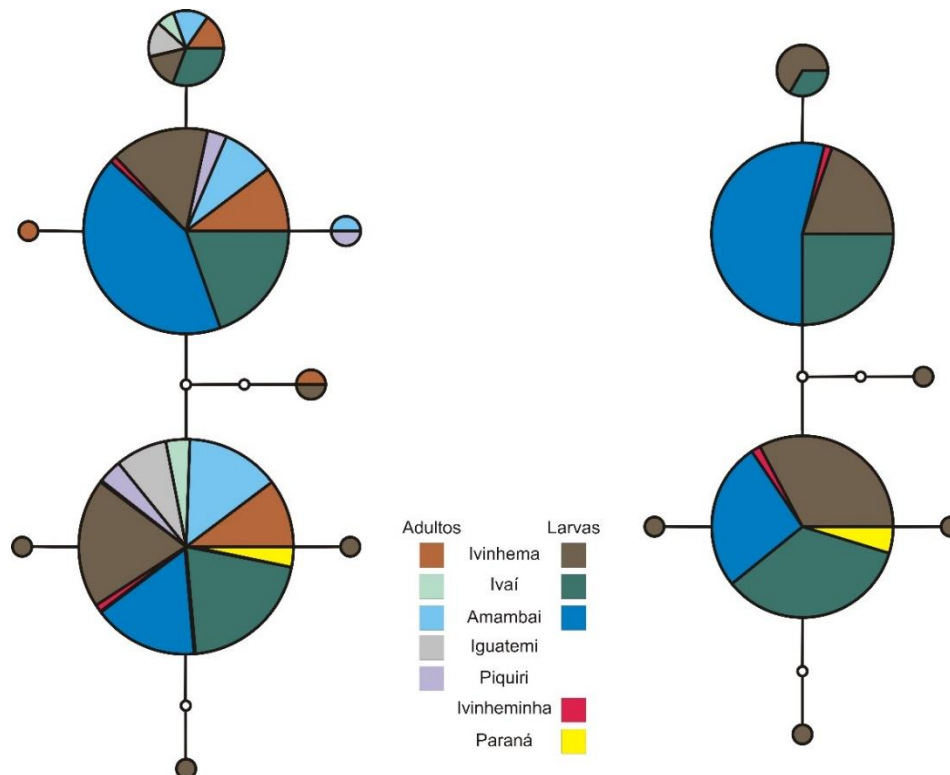


Figura 4. Rede de haplótipos do marcador mitocondrial D-loop de adultos e larvas (esquerda) e apenas de larvas (direita) de *P. corruscans* coletados na bacia do Alto Rio Paraná.

Discussão

A metodologia de teste de comportamento de *homing* para peixes neotropicais utilizando marcadores moleculares aplicados a larvas de diferentes tributários demonstrou-se promissora. A amostragem de larvas nas partes baixas dos tributários permitiu detectar diferenças genéticas entre populações de diferentes áreas de reprodução mesmo em pequenas escalas espaciais, estrutura genética frequentemente não detectada quando são utilizados apenas adultos para o teste de *homing*. Dessa forma, de acordo com as previsões estabelecidas nesse estudo, a presença de diferenciação genética entre populações de larvas provenientes das áreas de reprodução (tributários) com mistura de adultos das diferentes populações nas áreas de alimentação (calha principal), apesar da ausência de diferenciação genética entre as populações dos Rio Ivinheima e Ivaí, sugere que o pintado *P. corruscans* do Alto Rio Paraná realiza *homing*.

Populações que realizam o comportamento de *homing* devem apresentar padrão dendrítico de estrutura genética (diferenciação genética entre as populações que se reproduzem nas áreas de reprodução – tributários). Entretanto, padrões dendríticos de distribuição da diversidade genética podem ser decorrentes de outros possíveis cenários além do comportamento de *homing*. Simulações realizadas por Labonne *et al.* (2008) e Thomaz *et al.* (2016) suportam que populações que apresentam baixas taxas de dispersão podem apresentar diferenciação genética produto de isolamento por distância. Diferentemente do nosso cenário, contudo, nessas simulações, as populações se mantêm as áreas de alimentação distintas.

Adicionalmente, diferentes estudos de filogeografia utilizando marcadores microssatélites foram realizados em espécies de *Pseudoplatystoma* em diferentes escalas espaciais e apresentaram padrões de diferenciação genética distintos. Pereira *et al.* (2009) encontrou diferenciação genética entre 6 populações de *P. corruscans* nas bacias dos Rios Paraná e Paraguai distantes entre 500 e 3200 km. Abreu *et al.* (2009) encontrou diferenciação genética entre duas populações de *P. reticulatum* de dois braços do Alto Rio Paraguai 230 km distantes entre si. Prado (2014) encontrou diferenciação genética para *P. corruscans* e *P. reticulatum* apenas para as populações da bacia do Rio Paraná (distantes entre 500 e 1500 km), enquanto as populações das bacias do Rio Paraguai (distantes entre 300 e 1000 km) não apresentaram estruturação genética.

No presente estudo, em uma escala espacial menor, não foi encontrada diferenciação genética entre adultos de *P. corruscans*, distantes entre 25 e 135 km entre si. Em contrapartida, foi encontrada diferenciação genética entre a população de larvas do Rio

Amambai e as populações dos Rios Ivaí (distantes 25 km) e Ivinheima (distantes 55 km), enquanto as duas últimas não apresentaram diferenciação genética entre si (45 km distantes). Conseqüentemente, a mistura entre as populações na calha principal da bacia do Alto Rio Paraná (área de alimentação) com diferenciação genética entre populações de larvas de diferentes áreas de reprodução em escalas espaciais pequenas, o comportamento migrador de longas distâncias descrito para *P. corruscans* (Carolsfeld *et al.* 2003, Agostinho *et al.* 2004, Godinho *et al.* 2007) e a ausência de diferenciação genética entre populações mesmo distante 1000 km entre si na bacia do Rio Paraguai (Prado 2014) suportam que a estruturação genética encontrada nas populações de *P. corruscans* do Alto Rio Paraná não corresponde às previsões de isolamento por distância.

Fatores aleatórios, especificamente a deriva genética, possuem a capacidade de variar a frequência dos alelos mesmo em poucas gerações, especialmente aquelas com baixo tamanho efetivo populacional (Wright 1931, Slatkin 1995, Heggenes e Røed 2006, Holsinger e Weir 2009). As populações de *P. corruscans* da bacia do Alto Rio Paraná apresentaram valores reduzidos de tamanho efetivo populacional, o que poderia gerar diferenciação genética entre suas populações como efeito da deriva genética em uma geração a partir de uma população panmítica que não realiza *homing*. Esse mecanismo tem se apresentado comum em espécies com alta fecundidade, quando a alta variabilidade no sucesso reprodutivo entre indivíduos reduz as diversidades genéticas e os tamanhos efetivos populacionais dessas espécies, gerando diferenciação genética entre populações de adultos em pequenas escalas espaciais (hipótese *Sweepstakes Reproductive Success*, Hedgecock *et al.* 1982, Hedgecock 1994, Hedgecock e Pudovkin 2011). De fato, *P. corruscans* possui alta taxa de fecundidade (Suzuki *et al.* 2000, Arantes *et al.* 2013) e, nesse estudo, apresentou reduzidos tamanhos efetivos populacionais, o que poderia gerar a diferenciação genética entre as populações de *P. corruscans* do Rio Amambai com aquelas dos Rio Ivinheima e Ivaí. Contudo, uma vez que todas as populações apresentaram baixos tamanhos efetivos populacionais, seria esperado que houvesse diferenciação genética também entre as populações dos Rios Ivinheima e Ivaí, o que não foi observado. Além disso, se a estruturação genética de *P. corruscans* visualizada fosse resultado apenas da deriva genética, seria esperado que a diversidade genética das populações com baixo tamanho efetivo variasse entre períodos reprodutivos. Isso ocorreria pois a diferenciação genética gerada em uma geração se perderia durante a mistura das populações nos sítios de alimentação, e o período reprodutivo consecutivo causaria um novo evento de diferenciação, mas com as populações apresentando perfis genéticos diferentes daqueles gerados na geração anterior (Hedgecock e Pudovkin 2011). Alternativamente, em populações que realizam *homing*, espera-se que haja

manutenção do perfil genético das populações e da diferenciação genética entre elas ao longo de períodos reprodutivos consecutivos (Hansen *et al.* 2002). Todavia, o perfil genético da população do Rio Ivinheima se manteve igual ao longo dos dois períodos reprodutivos analisados. Assim, a ausência de diferenciação genética entre as populações do Rio Ivaí e do Rio Ivinheima e a manutenção do perfil genético da população do Rio Ivinheima nos dois períodos reprodutivos amostrados sugerem que a estrutura genética encontrada para as populações de *P. corruscans* do Alto Rio Paraná não pode ser explicada como efeito da deriva genética sobre uma população panmítica.

Dessa forma, a estrutura genética observada para as populações de *P. corruscans* da bacia do Alto Rio Paraná corresponde às previsões de padrão dendrítico de diferenciação genética esperado para populações que realizam *homing* e não pode ser explicado por isolamento por distância ou apenas por fatores aleatórios (deriva genética). Portanto, a diferença genética encontrada entre a população de larvas do Rio Amambai e dos Rios Ivinheima e Ivaí e a mistura das populações na calha principal do Rio Paraná (área de alimentação) suportam a hipótese que *P. corruscans* apresenta comportamento de *homing*. Contudo, a ausência de diferenciação genética entre as duas últimas populações dos Rios Ivaí e Ivinheima indica que outros mecanismos devem estar afetando a distribuição da diversidade genética da espécie na região.

Alterações ambientais podem afetar os padrões ecológicos, genéticos e comportamentais de espécies de peixes neotropicais (e.g. Godinho e Kynard 2006, 2008, Sanchez *et al.* 2006, Agostinho *et al.* 2007). A bacia do Alto Rio Paraná, particularmente, é altamente impactada por atividades humanas (poluição, introdução de espécies, aquicultura e barragens), e poucas regiões mantêm as características ambientais originais (Agostinho *et al.* 2007). Especialmente por fragmentar populações e alterar rotas migratórias, barragens possuem grande potencial para alterar a estrutura genética de espécies de peixes (e.g. Heggenes e Røed 2006, Paiva *et al.* 2006, Clarke *et al.* 2007, Pamponet *et al.* 2008, Horreo *et al.* 2011).

Diversos estudos têm testado os efeitos genéticos da fragmentação populacional causada por barragens artificiais sobre populações de peixes de dulcícolas neotropicais, alguns deles sem evidências de alterações na distribuição da diversidade genética das espécies (e.g. Hatanaka *et al.* 2006, Carvalho-Costa *et al.* 2008, Barroca *et al.* 2012, Sanches *et al.* 2012, Marteleto 2015, Pil *et al.* dados não publicados). Entretanto, a fragmentação de populações decorrente de barreiras artificiais deve afetar diferentemente a estrutura genéticas de populações de espécies que realizam *homing*.

Em espécies dulcícolas que realizam *homing*, espera-se que os indivíduos de diferentes populações estejam distribuídos ao longo da área de alimentação, frequentemente nos trechos baixos dos tributários e na calha principal da bacia. Portanto, durante a construção e fechamento de represas, indivíduos que se originalmente se reproduzem em tributários à montante da barragem, mas que estão se alimentando à jusante dessa, podem ficar isolados de seus tributários natais. Esses indivíduos provavelmente irão se reproduzir nos tributários à jusante mais próximos das barragens, reproduzindo um comportamento descrito para *Prochilodus argenteus* da bacia do Rio São Francisco (Sato *et al.* 2005, Godinho e Kynard, 2006, 2008), *Pr. lineatus* da bacia do Alto Rio Paraná (Antonio *et al.* 2007) e peixes migradores em rios temperados (Brown *et al.* 2013). Diante desse cenário, dispersores (indivíduos que se reproduziam à montante e ficaram isolados à jusante da barragem) seriam incorporados no *pool* reprodutivo das populações dos tributários imediatamente à jusante da barragem, tanto das margens esquerda e direita. Como as populações desses dois tributários receberiam putativamente um grande aporte de dispersores provenientes das populações originárias à montante da barragem, espera-se que ocorra homogeneização genética entre elas. Uma vez que a hibridização pode ocorrer em poucas gerações, é possível que as diferenças genéticas entre essas populações, decorrentes do comportamento de *homing*, sejam perdidas mesmo a curto prazo. Suportando essa hipótese, Baggio *et al.* (Cap. IV) apresenta simulações que indicam que a construção de uma barragem na calha principal de uma bacia causa homogeneização genética entre populações de peixes que realizam *homing*, especialmente naquelas populações adjacentes à barragem, mesmo na primeira geração.

Dessa forma, a homogeneização genética esperada em decorrência da barragem de Porto Primavera, localizadas à montante da área de estudo, pode explicar a ausência de diferenciação genética entre as populações de *P. corruscans* dos Rios Ivinheima e Ivaí. O Rio Baía, primeiro tributário da margem direita à jusante da UHE de Porto Primavera, não é utilizado para reprodução por espécies migradoras (Bialecki *et al.* 2005, Sanchez *et al.* 2006) e o Rio Paranapanema, primeiro tributário da margem esquerda, possui a barragem de Rosana próximo a sua foz. Dessa forma, os Rios Ivinheima e Ivaí são os tributários das margens direita e esquerda, respectivamente, mais próximos à UHE de Porto Primavera utilizados por peixes migradores para reprodução, e têm apresentado grandes abundâncias de peixes migratórios mesmo após o fechamento da barragem em 1998 (Sanchez *et al.* 2006). A UHE de Porto Primavera possui escadas e elevadores para passagem de peixes, mas esses mecanismos têm se demonstrado ineficazes na manutenção do fluxo gênico entre populações em diversos rios neotropicais (Pelicice e Agostinho 2008, Pompeu *et al.* 2012). A possível perda de diversidade genética e de seu padrão de distribuição decorrente desse processo

pode ser prejudicial para essas populações, com a possível perda de adaptação local e da capacidade de responder a alterações ambientais (Olden *et al.* 2004). Esse trecho da bacia do Alto Rio Paraná possui locais (tributários, lagos, lagoas) com características ambientais distintas (e.g. aspectos físico-químicos da água, vegetação marginal, corredeiras) que têm apresentado correlação com os padrões de distribuição e abundância de larvas (e.g. Baumgartner *et al.* 1997, 2004, 2008, Bialetzki *et al.* 2005, Daga *et al.* 2009, Gogola *et al.* 2013, Barzotto *et al.* 2015). Contudo, a correlação entre características genéticas ou fenotípicas de espécies de peixes e suas respectivas abundâncias nos diferentes tributários ainda não foi testada para peixes neotropicais.

A hipótese de influência das barragens à montante sobre a estrutura genética de *P. corruscans* poderia ser testada de maneira mais conclusiva caso larvas de *P. corruscans* estivessem presentes nas amostras coletadas dos Rios Iguatemi e Piquiri. Apesar do relativo esforço amostral (20-30 amostras obtidas em cada uma das 6 noites de coleta em cada rio em fevereiro e novembro de 2014), a ausência de larvas dessa espécie nesses locais é condizente com a baixa quantidade de larvas encontradas nesses rios em estudos pretéritos (e.g. Baumgartner *et al.* 2004, 2008). Assim, a utilização desses tributários para reprodução de peixes migradores parece não ser frequente.

As análises da estrutura genética das populações de larvas e adultos de *P. corruscans* da bacia do Alto Rio Paraná, portanto, sugerem que essas populações realizam comportamento de *homing*, mas que o padrão dendrítico de distribuição da diversidade genética tem sido afetada por alterações ambientais na região, especialmente pela presença da barragem de Porto Primavera. Contudo, testes definitivos dessa metodologia e da existência de comportamento de *homing* para *P. corruscans* podem ser realizados em outros rios neotropicais não impactados por barramentos, o que possibilitaria isolar o efeito do comportamento de *homing* sobre a estrutura genética de espécies de Pimelodidae de efeitos antrópicos (e.g. barramentos). A avaliação do comportamento de *homing* para espécies de peixes neotropicais possui importantes implicações para a definição de estratégias de conservação, manejo e mitigação do impacto de barramentos sobre a diversidade genética dessas espécies em rios já represados e naqueles em que há o planejamento da construção de novas barragens, e seus resultados podem ser extrapolados para a conservação de outras espécies em outros trechos da bacia do Alto Rio Paraná ou mesmo em outras bacias.

Referências Bibliográficas

Abreu, M.M., Pereira, L.H.G., Vila, V.B., Foresti, F. e Oliveira, C. (2009) Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. *Genetics and Molecular Biology* 32, 868-873.

Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Suzuki, H.I. e Júlio-Jr., H.F. (2003) Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In *Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status* (eds. Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C. e Baer, A.). World Fisheries Trust, Canadá, pp.19-98.

Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Veríssimo, S. e Okada E.K. (2004) Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14, 11-19.

Agostinho, A.A., Pelicice, F.M. e Gomes, L.C. (2008) Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Brazilian Journal of Biology* 68, 1119-1132.

Agostinho, A.A., Pelicice, F.M., Petry, A.C., Gomes, L.C. e Júlio-Jr., H.F. (2007) Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation, *Aquatic Ecosystem Health & Management* 10, 174 – 186.

Albert, J.S., Petry, P. e Reis, R.E. (2011) Major biogeography and phylogenetics patterns. In: *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (eds. Albert, J.S. e Reis, R.E.). University of California Press, Los Angeles, pp. 21-58.

Antonio, R.R., Agostinho, A.A., Pelicice, F.M., Bailly, D. e Dias, J.P.H. (2007) Blockage of migration routes by dam construction: can migratory fish find alternative routes? *Neotropical Ichthyology* 5, 177– 184.

Arantes, F.P., Sato, Y., Sampaio, E.V., Rizzo E. e Bazzoli, N. (2013) Spawning induction and fecundity of the commercial native fish species from the São Francisco River basin, Brazil, under hatchery conditions. *Agricultural Sciences* 4, 382-388.

Bandelt, H-J., Forster, P. e Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology Evolution*, 16, 37-48.

Barroca, T.M., Santos, G.B., Duarte, N.V.R. e Kalapothakis, E. (2012). Evaluation of genetic diversity and population structure in a commercially important freshwater fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae) using complex hypervariable repeats. *Genetics and Molecular Research* 11, 4456-4467.

Barthem, R.B. e Goulding, M. (1997) Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos. Sociedade Civil Mamirauá/CNPq. Tefé, 144 p.

Barzotto, E., Sanches, P.V., Bialetzki, A., Orvati, L. e Gomes, L.C. (2015) Larvae of migratory fish (Teleostei: Ostariophysi) in the lotic remant of the Paraná River in Brazil. *Zoologia* 32, 270-280.

Batista, J.S. (2010) *Caracterização genética da dourada – Brachyplatystoma rousseauxii, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios conservação e manejo*. Tese de Doutorado, INPA, 107p.

Batista, J. e Alves-Gomes, J. (2006) Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research* 5, 723-740.

Baumgartner, G., Nakatani, K., Cavicchioli, M. e Baumgartner, M.S.T. (1997) Some aspects of the ecology of the fish larvae in the floodplain of the High Paraná River, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 14, 551-563.

Baumgartner, G., Nakatani, K., Gomes, L.C., Bialetzki, A., Sanches, P.V. e Makrakis, M.C. (2004) Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River, Brazil. *Environmental Biology of Fishes* 71, 115–125.

Baumgartner, G., Nakatani, K., Gomes, L.C., Bialetzki, A., Sanches, P.V. e Makrakis, M.C. (2008) Fish larvae from the upper Paraná River: Do abiotic factors affect larval density? *Neotropical Ichthyology* 6, 551-558.

Bialetzki, A., Nakatani, K., Sanches, P.V., Baumgartner, G. e Gomes, L.C. (2005) Larval fish assemblage in the Baía River (Mato Grosso do Sul State, Brazil): temporal and spatial patterns. *Environmental Biology of Fishes* 73, 37-47.

Bouza, C., Arias, J., Castro, J., Sánchez, L. e Martinez, P. (1999). Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta* L. at the Southern limit of the distribution range of the anadromous form. *Molecular Ecology* 8, 1991–2001.

Brown, J.J., Limburg, K.E., Waldman, J.R., Stephenson, K., Glenn, E.P. e Juanes, F. (2013) Fish and hydropower on the U.S. Atlantic coast: failed fisheries policies from half-way technologies. *Conservation Letters* 6, 280–286.

Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C. e Baer, A. (2003). *Migratory fishes of South America. Biology, fisheries and conservation status*. World Fisheries Trust, Canadá. 383p.

- Carvajal-Vallejos, F.M., Duponchelle, F., Desmarais, E., Cerqueira, F., Querouil, S., Nuñez, J. e Renno, J.F. (2014) Genetic structure in the Amazonian catfish *Brachyplatystoma rousseauxii*: influence of life history strategies. *Genetica* 142, 323-336.
- Carvalho-Costa, L.F., Hatanaka, T. e Galetti, P.M. (2008). Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology* 31, 377-380.
- Clarke, A.D., Telmer, K.H. e Shrimpton, J.M. (2007) Habitat use and movement patterns for a fluvial species, the Arctic grayling, in a watershed impacted by a large reservoir: evidence from otolith microchemistry. *Journal of Applied Ecology* 44, 1156–1165.
- Daga, V.S., Gogola, T.M., Sanches, P.V., et al. (2009) Fish larvae assemblages in two floodplain lakes with different degrees of connection to the Paraná River, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 7, 429-438.
- Earl, D.A. e vonHoldt, B.M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, 359-361.
- Evanno, G., Regnaut, S. e Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564–567.
- Formiga-Aquino, K. (2004) Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões. Dissertação de Mestrado, INPA, Manaus, 73 p.
- Gerking, S.D. (1959) The restricted movement of fish populations. *Biological Review* 34, 221–242.
- Godinho, A.L. e Kynard, B. (2006). Migration and Spawning of Radio-Tagged Zulega *Prochilodus argenteus* in a Dammed Brazilian River. *Transactions of the American Fisheries Society* 135, 811–824.
- Godinho, A.L. e Kynard, B. (2008). Migratory fishes of Brazil: Life history and fish passage needs. *River Research and Applications* 25, 702-712.

- Godinho, A.L., Kynard, B. e Godinho, H.P. (2007) Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco River, Brazil. *Environmental Biology of Fish* 80, 421–433.
- Gogola, T.M., Sanches, P.V., Gubiani, E.A. e Silva, P.R.L. (2013). Spatial and temporal variations in fish larvae assemblages in Ilha Grande National Park, Brazil. *Ecology of Freshwater Fish* 22, 95-105.
- Hansen, M.M., Ruzzante, D.E., Nielsen, E.E., Bekkevold, D. e Mensberg, K.L.D. (2002) Long-term effective population sizes, temporal stability of genetic composition and potential for local adaption in anadromous brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Molecular Ecology* 11, 2523-2535.
- Hansen, M.M., Skaala, Ø., Jensen, L.F., Bekkevold, D. e Mensberg, K.L. (2007) Gene flow, effective population size and selection at major histocompatibility complex genes: brown trout in the Hardanger Fjord, Norway. *Molecular Ecology* 16, 1413–1425.
- Hatanaka, T., Henrique-Silva, F., Galleti-Jr., M. (2006). Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica* 126,153–159.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. e Dewaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society of London* 270, 313-321.
- Hedgcock, D. (1994) Does variance in reproductive success limit effective population size of marine organisms? In: *Genetics and evolution of aquatic organisms* (Eds. Beaumont, A.). Chapman & Hall, London, 122–134.
- Hedgcock, D. e Pudovkin, A.I. (2011). Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary. *Bulletin of Marine Science* 87, 971-1002.
- Hedgcock, D., Tracey, M.L. e Nelson, K. (1982) Genetics. In: *The biology of crustacea* (Eds. Abele, L.G.). Academic Press, New York, 297–403.
- Heggenes, J. e Røed, K.H. (2006). Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. *Ecology of Freshwater Fish* 15, 366–375.
- Holsinger, K.E. e Weir, B.S. (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting Fst. *Nature Reviews* 10, 639-550.

Horreo, J.L., Martinez, J.L., Ayllon, F., Pola, I.G., Monteoliva, J.A., Héland, M. e Garcia-Vazquez, E. (2011). Impact of habitat fragmentation on the genetics of populations in dendritic landscapes. *Freshwater Biology* 56, 2567-2579.

Ivanova, N.V., Zemlak, T.S., Hanner, R.H. e Hebert, P.D.N. (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7, 544-548.

Junge, C., Museth, J., Hindar, K., Kraabøl, M. e Asbjørn Vøllestad, L. (2014) Assessing the consequences of habitat fragmentation for two migratory salmonid fishes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 24, 297-311.

Labonne, J., Ravigne, V., Parisi, B. e Gaucherel, C. (2008) Linking dendritic networks structure to population demogenetics: the downside of connectivity. *Oikos* 117, 1479–1490.

Lanjeani, F., Castro, R.M.C., Oyakawa, O.T., Shibatta, O.A., Pavanelli, C.S. e Casatti, L. (2007) Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*, 7, 181-197.

Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J.M. e Sherwin, W.B. (1997). Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89, 238-247.

Marteletto, F.M. (2015). *Os efeitos da introdução de barreiras artificiais em rios sobre a genética populacional em peixes*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, 105 p.

Nakatani, K., Agostinho, A.A., Baumgartner, G., Bialezki, A., Sanches, P.V., Makrakis, M.C. e Pavanelli, C.S. (2001) *Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação*. EDUEM, Maringá, 378 p.

Narum, S.R. (2006) Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. *Conservation Genetics* 7, 783-787.

Olden, J.D., Poff, N.L., Douglas, M.R., Douglas, M.E. e Fausch, K.D. (2004). Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology and Evolution* 19, 18-24.

Östergren, J., Nilsson, J. e Lundqvist, H. (2012). Linking assignment testes with telemetry enhances understanding of spawning migration and homing in sea trout *Salmo trutta* L. *Hydrobiologia* 691, 123-134.

Paiva, S.R., Dergam, J.A. e Machado, F. (2006) Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bifasciatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Hydrobiologia* 560, 393–404.

Pamponet, V.C.C., Carneiro, P.L.S., Affonso, P.R.A.M., Miranda, V.S., Silva Junior, J.C., Oliveira, G.C. Gaiotto, F.A. (2008) A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax* aff. *bifasciatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6, 621-630.

Pavanelli, C.S., Britski, H.A. e Veríssimo, S. (2001) Caracterização da ictiofauna do reservatório de Corumbá (Characterization of the ichthyofauna in the Corumbá Reservoir). In: Agostinho AA, Fuji R & Veríssimo S. (Eds.). *Biologia e ecologia de peixes do reservatório de Corumbá: bases para o manejo*. Maringá. 39–80.

Pelicice, F.M. e Agostinho, A.A. (2008). Fish passage facilities as ecological traps in large Neotropical Rivers. *Conservation Biology* 22, 180-188.

Pereira, L.H.G., Foresti, F. e Oliveira, C. (2009) Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests *homing* behavior. *Ecology of Freshwater Fish* 18, 215–225.

Petriere Jr., M., Agostinho, A.A., Okada, E.K. e Julio Jr., H.F. (2002) Review of the fisheries in the Brazilian portion of the Paraná/Pantanal basin. In *Management and Ecology of Lake and Reservoir Fisheries* (Eds. Cowx, I.G.). Fishing News Books, Oxford, 401 p.

Piry, S., Luikart, G. e Cornuet, J.M. (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90, 502–503.

Pompeu, P.S., Agostinho, A.A. e Pelicice, F.M. (2012). Existing and future challenges: the concept of successful fish passage in South America. *River Research and Applications* 28, 504-512.

Prado, F.D. (2014) Marcadores moleculares na identificação de híbridos e introgressão genética em populações de *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*. Tese de doutorado. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 131 p.

Primmer, C.R., Veselov, A.J., Zubchenko, A., Poututkin, A., Bakhmet, I., Koskinen, M.T. (2006) Isolation by distance with a river system: genetic population structuring of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, in tributaries of the Varzuga River in northwest Russia. *Molecular Ecology* 15, 653-666.

Prioli, A.A., Prioli, L.M., Prioli, S.M.A.P. *et al.* (2003) Análise genética de *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e *P. fasciatum* (cachara) e de um híbrido, com base em marcadores

mitocondriais e nucleares. In: Agostinho AA, Thomaz SM, Rodrigues L, Gomes LC. *A Planície de inundação do Alto Rio Paraná*. Relatório Técnico PELD/CNPq.

Pritchard, J.K., Stephens, M. e Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

Ratnasingham, S. e Hebert, P.D.N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7, 355-364.

Reis, R.E., Kullander, S.O. e Ferraris, C.J. (2003) Introduction. In: *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America* (Eds. Reis, R.E., Kullander, S.O. e Ferraris, C.J.) Edipucrs, Porto Alegre, 1–3.

Revadalves, E., Pereira, L.H.G., Foresti, F. e Oliveira, C. (2005) Isolation and characterization of microsatellites loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* 5, 462-465.

Rodrigues, F.C. (2009) Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop de quatro localidades da Amazônia: diferenças entre calha e tributários. Dissertação de Mestrado, INPA, Manaus, 80 p.

Sanches, A., Galetti Jr., P.M., Galzerani, F., Derazo, J., Cutilak-Bianchi, B. e Hatanaka, T. (2012). Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Latin America Journal of Aquatic Research* 40, 177-186.

Sanches, P.V., Nakatanu, K., Bialezki, A., Baumgartner, G., Gomes, L.C. e Luiz, E.A. (2006) Flow regulation by dams affecting ichthyoplankton: the case of the Porto Primavera Dam, Paraná River, Brazil. *River Research and Applications* 22, 555-565.

Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E., Boschi, M.B. e Miranda, M.O.T. (2005) Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, southeastern Brazil. *River Research and Applications* 21, 939–950.

Slatkin, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139, 457–462.

Sunnucks, P., Wilson, A.C.C., Beheregaray, L.B., Zenger, K., French, J. e Taylor, A.C. (2000). SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* 9, 1699–1710.

Suzuki, H.I., Agostinho, A.A. e Winemiller, K.O. (2000) Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy on loricariid catfishes of the Paraná River, Brazil. *Journal of Fish Biology* 57, 791-807.

Thomaz, A.T., Christie, M.R. e Knowles L.L. (2016) The architecture of river networks can drive the evolutionary dynamics of aquatic populations. *Evolution*, doi: 10.1111/evo.12883.

van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. e Shipley, P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535–538.

Vari, R.P. e Malabarba, L.R. (1998) Neotropical Ichthyology: An overview. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (Eds. Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, C.A.S., Lucena, Z.M.S.). Museu de Ciências e Tecnologia, Porto Alegre, 1–11.

Waples, R.S. e Do, C. (2008) LDNe: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8,753–756.

Wollebæk, J., Heggenes, J. e Røed, K.H. (2011) Population connectivity: dam migration mitigations and contemporary site fidelity in arctic char. *BMC Evolutionary Biology* 11, 207.

Wright, S. (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16, 97–159.

CAPÍTULO III

Short Communication

Hybrids between *Pseudoplatystoma corruscans* and *P. reticulatum* (Siluriformes, Pimelodidae) previously reported in the Upper Paraná River are likely escapes from aquaculture farms: evidence from microsatellite markers

Rafael A. Baggio^{1,2,3}, Caroline B. Moretti¹, Andréa Bialezki⁴ and Walter A. Boeger^{1,2,3}

¹ Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

² Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

³ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais. Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Corresponding author: Rafael A. Baggio. rbaggioufpr@gmail.com. Laboratório de Ecologia Molecular, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim das Américas, CEP 81531-980, CP 19073, Curitiba, Paraná, Brazil. +55 41 33611765.

- Artigo formatado e submetido para revista *Zoologia* como *short communication*.

Abstract

The production of hybrids of the *pintado* (*Pseudoplatystoma corruscans*) and *cachara* (*P. reticulatum*) in captivity has generated many concerns about the possibility of introduction of farmed hybrids into natural environments. In the last decade, hybrids between these species, known as *Pintachara* or *Cachapinta*, were reported from different regions of the Upper Paraná River basin. Prospection of these hybrids is important in order to orient conservation programs for the species involved. Knowledge on the presence of these hybrids will direct conservation strategies towards the prevention and/or mitigation of the effects of cross breeding in natural populations of *P. corruscans* (the native species of the genus) and farmed hybrids. In this study, we apply molecular tools on fish larvae to detect the presence and assess the origin (natural hybridization or escapes from fish farms) of hybrids in natural water bodies. Nine microsatellites markers were used to detect signals of hybridization and introgression of *P. reticulatum* in larvae and adults of *P. corruscans* in Upper Paraná River basin, between Itaipu Dam and Porto Primavera Dam. The specimens were sampled in the Upper Paraná channel and in tributaries where hybrids were detected in the past, during two reproductive seasons. Despite of that, no signal of hybridization and introgression was found in the 171 larvae and 75 adults sampled, suggesting the origin of the specimens detected in previous studies from escapes of aquaculture farms.

Keywords: Conservation genetics; Fish larvae; Interspecific hybrids; Introgression; Molecular markers.

Hybridization and introgression among species is one of the greatest concern regarding the maintenance of the global biodiversity (RHYMER & SIMBERLOFF 1996, ALLENDORF et al. 2001, OLDEN et al. 2004). Detection of hybrids in natural environments is increasing as a result of environmental degradation, introduction of foreign species, development of artificial interspecific hybrids for aquaculture, and change of species distribution associated with climate changes (RHYMER & SYMBERLOFF 1996, ALLENDORF et al. 2001, SCRIBNER et al. 2001, WALTHER et al. 2009). Hybridization can homogenize distinct populations and species, reduce local adaptation, and genetic diversity (OLDEN et al. 2004).

The *pintado*, *Pseudoplatystoma corruscans* (SPIX & AGASSIZ 1829), is the single native species of *Pseudoplatystoma* from Upper Paraná River basin (BUIRAGO-SUÁREZ & BURR 2007). This species is the largest catfish and one of the most widely explored fish in this region (PETRERE-JR. et al. 2002), but has suffered reduction of its natural stocks due to the presence of dams, fishery activities, and habitat loss (WELCOMME 1985). Thus, as consequence of economical demands, farming of the *pintado* has increased in this region, including its hybrid with the *cachara*, *Pseudoplatystoma reticulatum* (EIGENMANN & EIGENMANN 1889) (CARVALHO et al. 2013). The possibility of escapes from aquaculture farms has created concern on the introduction and potential hybridization between natural populations of *P. corruscans* and the farmed hybrids of *Pintachara* (crossbreed between female *pintado* and male *cachara*) and *Cachapinta* (crossbreed between female *cachara* and male *pintado*) (FERNANDES et al. 2003, PORTO-FORESTI et al. 2008, PRADO et al. 2012a, HASHIMOTO et al. 2012). Furthermore, *cachara* is native from the Paraguay River and Lower Paraná River basin (BUIRAGO-SUÁREZ & BURR 2007) but adult specimens have been reported in the Upper Paraná River basin, introduced by aquaculture (VAINI et al. 2014). Natural hybridization between these species is possible, since hybrids are fertile (PRADO et al. 2012b), but highly undesirable for the maintenance of the genetic integrity of the natural local populations of *P. corruscans* (RHYMER & SIMBERLOFF 1996, ALLENDORF et al. 2001).

Hybrids between *P. corruscans* and *P. reticulatum* are often reported in the Aquidauana River (Paraguay River basin), in the Mogi-Guaçu River and in the Ivinheima River sub-basin (Upper Paraná River basin) (PRADO et al. 2012a, VAINI et al. 2014). Presently, they have been reported from the Upper Paraná River basin only sporadically between the Itaipu Dam and Porto Primavera Dam (E.A. ROSA, pers. comm., A.A. SILVA, pers. comm.). Genetic markers are important tools to detect the presence of hybrids (SANZ et al. 2009), and microsatellites markers have already been used to detect hybrids between *P. corruscans* and *P. reticulatum* in the recent past (e.g. PRADO et al. 2012a, CARVALHO et al. 2013).

Thus, in this study, we apply microsatellite markers to detect evidences of hybridization in larvae and adults of *Pseudoplatystoma* spp. in the Upper Paraná River basin, between Itaipu Dam and

Porto Primavera Dam. We consider that the use of larvae in prospection of hybrids in the natural environment is more informative than studies exclusively with adults, especially in migratory species. The use of larvae allows us to assess both the presence and the origin of hybrids. Since larvae of migratory fish are passively carried in the water flow (NAKATANI et al. 2001), detecting hybrid larvae reduces the range of possible origins of escape and reproductive areas of hybridization that are contributing to the presence of hybrids in natural water bodies. This information can contribute significantly with the development of conservation programs for specific rivers, maximizing their efficiency and minimizing costs.

Ichthyoplankton were collected from February 2012 to October 2015 (the reproductive season of *Pseudoplatystoma* spp. occurs between October and March, GODINHO et al. 2007) in the Upper Paraná River basin (between Itaipu and Porto Primavera Dam) and its main tributaries (Ivaí, Ivinheima, Ivinheiminha, Iguatemi, Piquiri and Amambai Rivers) (Supplementary data 1) using a conical-cylindrical plankton net (500 µm mesh) in the water surface for a period of 10 min, at night. Samples were fixed in 70% ethanol. The larvae were identified preliminarily by morphological methods using NAKATANI et al. (2001) and molecular methods using the DNA barcode method (HEBERT et al. 2003, see also CARVALHO et al. 2012). A database of pure species was created with 75 adults of *P. corruscans* collected at the same sites than the larvae (Ivaí, Ivinheima, Iguatemi, Piquiri and Amambai Rivers) and 20 individuals of *P. reticulatum* were obtained from the Aquidauana River (Paraguay River basin) (Supplementary data 1). Specimens of *P. corruscans* and *P. reticulatum* from the Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) at the Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil (catalog number NUP 12798 and NUP 3587) were used as reference adult specimens. The larvae were photographed and their heads were deposited in the Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) (accession numbers NUP 17754 to NUP 17757); the remaining larvae were used in genetic analysis.

Total DNA of the larvae were isolated with the DNeasy kit[®] (Qiagen), and the DNA of adult specimens were extracted with the EZ DNA[®] kit (Biological Industries). The amplification reaction of the mitochondrial gene cytochrome oxidase, subunit 1 (COI), was carried out in 25 µl PCR with 25x buffer, 3 mM of MgCl₂, 0.4 µM of dNTP, 1 pmol of each primer (FF2d and FR1d, IVANOVA et al. 2007) and 20-40 ng of DNA. The PCR program included an initial denaturation at 94 °C for 4 min, 35 cycles at 94 °C for 4 min for denaturation, annealing at 58 °C for 45 s, extension at 72 °C for 1 min, and a cycle at 72 °C for 5 min for final extension. Sequencing with the BigDye[®] kit (Applied Biosystems) followed the manufacturer's protocol. The sequencing products were purified with Sephadex G-50 (GE) and sequenced with an ABi 3130 automatic sequencer (Applied Biosystems). Barcode identification of each larva was performed in BoldSystems v3 (RATNASINGHAM & HEBERT 2007).

Larvae and the adults were genotyped for nine microsatellites loci (Pcor01, Pcor02, Pcor05, Pcor07, Pcor08, Pcor10, Pcor21, Pcor23, Pcor28) described by REVALDAVES et al. (2005) and PEREIRA et al. (2009) to test for hybridization between the two species of *Pseudoplatystoma*. The 10 ul reactions contained 10x buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTP, 0.05 pmol of each primer, 0.3 U of Taq and 5 ng of DNA. The PCR conditions included an initial denaturation at 95° C for 3 min, 35 cycles at 95° C for 30 s for denaturation, 55° C (50° C for Pcor10) for 1 min to annealing and 72° C for 1 min for extension, and a cycle at 72° C for 1 h for final extension. Genotyping was carried out in an ABi 3130 sequencer (Applied Biosystems).

We analyzed the presence of null alleles and scoring errors using the software Micro-Checker 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al. 2004). Hardy-Weinberg disequilibrium, linkage disequilibrium, diversity, and genetic differentiation analysis were done using the software Arlequin 3.5 (EXCOFIER & LISCHER 2010). Whenever necessary (multiple analyses), critical p-values were corrected using the B-Y correction (NARUM 2006). Assignment tests were used to assign larvae to their respective pure species or hybrid cluster. Five runs of 5 million of generations (500 thousand of burn-in) and $1 < K < 5$ were performed in the software Structure 2.3.1 (PRITCHARD et al. 2000). The *ad hoc* method of EVANNO et al. (2005), implemented on the online tool Structure Harvester (EARL & VONHOLDT 2012), was used to assess the most likelihood value of K. Individuals with $0.1 < q < 0.9$ were considered hybrids (VÄHÄ & PRIMMER 2006). A run of 5 million of generations (500 thousand of burn-in) in the software NewHybrids 1.1 (ANDERSON & THOMPSON 2002) was used to estimate the posterior probability of individuals belonging to the categories pure *P. corruscans*, pure *P. reticulatum*, hybrids F1 and F2, and both backcrosses (F1 with each pure population).

A total of 171 larvae of *Pseudoplatystoma* species, all identified as *P. corruscans* by morphological and DNA barcode methods (GenBank accession numbers KU220028 - KU220190), were collected and genotyped for the 9 loci of microsatellites (Table 1). All larvae were in the pre-flexion or flexion stage.

The presence of null alleles, scoring errors, linkage, and Hardy-Weinberg disequilibrium were not recurrent among the populations (larvae and adults of *P. corruscans* and *P. reticulatum*) and among the loci. Adults of *P. corruscans* and *P. reticulatum* presented different values of genetic diversity (0.61 and 0.49, respectively – Table 2) and numbers of alleles (mean of 9.8 and 6.6, respectively). Adults of *P. corruscans* presented 88 alleles of which 69 are private. *Pseudoplatystoma reticulatum* presented 54 alleles, of which 35 are private. The 104 private alleles of these species compose 84.6% of the 123 alleles found. Although all loci presented private alleles, only the loci Pcor07, Pcor10, Pcor21 and Pcor23 did not present overlap in allele range (Table 2).

Table 1. Number total (N) and per reproductive period (October to March - N₁: 2012-2013, N₂: 2013-2014, N₃: 2014-2015, N₄:2015-2016) of larvae of *Pseudoplatystoma* spp. sampled, gene diversity (H), inbreeding coefficient (Fis), number of alleles of each 9 microsatellites loci. Bold numbers of Fis represent significant values (p < 0.05) and bold number of the number of alleles represent deviation of Hardy-Weinberg equilibrium (p < 0.0177 after B-Y correction).

Population	N _t	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N _g	H	Fis	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor07	Pcor08	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28	Mean
Ivinheima	47	24	23			47	0.60	0.03	5	9	10	3	3	17	14	13	5	8.8 ± 5.1
Amambai	62		53		9	62	0.61	-0.09	6	9	9	2	4	16	14	15	4	8.8 ± 5.2
Ivaí	57		9	48		57	0.58	0.01	8	8	9	2	5	17	15	15	5	9.4 ± 5.4
Paraná	3		3			3	0.69	0.05	2	4	2	2	1	5	3	4	2	3.0 ± 1.2
Ivinheiminha	2		2			2	0.61	-0.14	3	4	4	1	1	4	3	3	1	3.5 ± 0.6
Overall	171	24	90	48	9	171	0.61	-0.01	8	12	12	3	6	25	18	19	5	12.0 ± 7.4

Table 2. Number of adults of *P. corruscans* and *P. reticulatum* sampled (N), gene diversity (H), inbreeding coefficient (Fis), number of alleles (N_a), range of alleles (R_a) and number of private alleles (P_a) for each of 9 microsatellites loci. Bold number of Fis represent significant values and bold number of N_a represent deviation of Hardy-Weinberg equilibrium.

	N	H	Fis	Pcor01			Pcor02			Pcor05			Pcor07		
				N _a	R _a	P _a	N _a	R _a	P _a	N _a	R _a	P _a	N _a	R _a	P _a
<i>P. corruscans</i>	75	0.61	0.02	6	86 - 110	4	11	191 - 215	4	11	138 - 176	4	2	208 - 210	2
<i>P. reticulatum</i>	20	0.48	0.04	6	104 - 120	4	11	185 - 217	4	11	136 - 158	4	5	246 - 260	5

	Pcor08			Pcor10			Pcor21			Pcor23			Pcor28		
	N _a	R _a	P _a	N _a	R _a	P _a	N _a	R _a	P _a	N _a	R _a	P _a	N _a	R _a	P _a
<i>P. corruscans</i>	5	163 - 177	3	19	174 - 266	19	15	114 - 162	15	15	99 - 142	15	4	95 - 105	3
<i>P. reticulatum</i>	11	167 - 195	9	3	146 - 168	3	3	103 - 107	3	3	89 - 93	3	1	99	0

Tests of genetic differentiation support disjunction between the adults of species according to AMOVA, Fst, and Rst analyses. A total of 74% and 38% of the total genetic variation is due to differences between the species according with Rst (Rst = 0.74, p = 0.00) and Fst methods (Fst = 0.38, p = 0.00), respectively. The locus-by-locus AMOVA supports this distinction: significant Fst values varied between 0.11 and 0.74, and Rst values between 0.48 and 0.99, except for the Rst analysis with the Pcor02 locus (Rst = 0.00, p = 1.00).

The assignment analysis supports disjunction of these species (Figure 1). The analysis in Structure using the most probable number of groups is 2 (K = 2), according to the method of EVANNO et al. (2005), indicates that 99.7% of the genotype of adults of *P. corruscans* and 99.7% of the genotype of the *P. reticulatum* individuals belonged to their own independent clusters. All individuals presented more than 95% of its genotype relative to its species cluster. Likewise, all adults of each species belong to its pure species with probabilities higher than 99.7%, as suggested by the NewHybrid analysis.

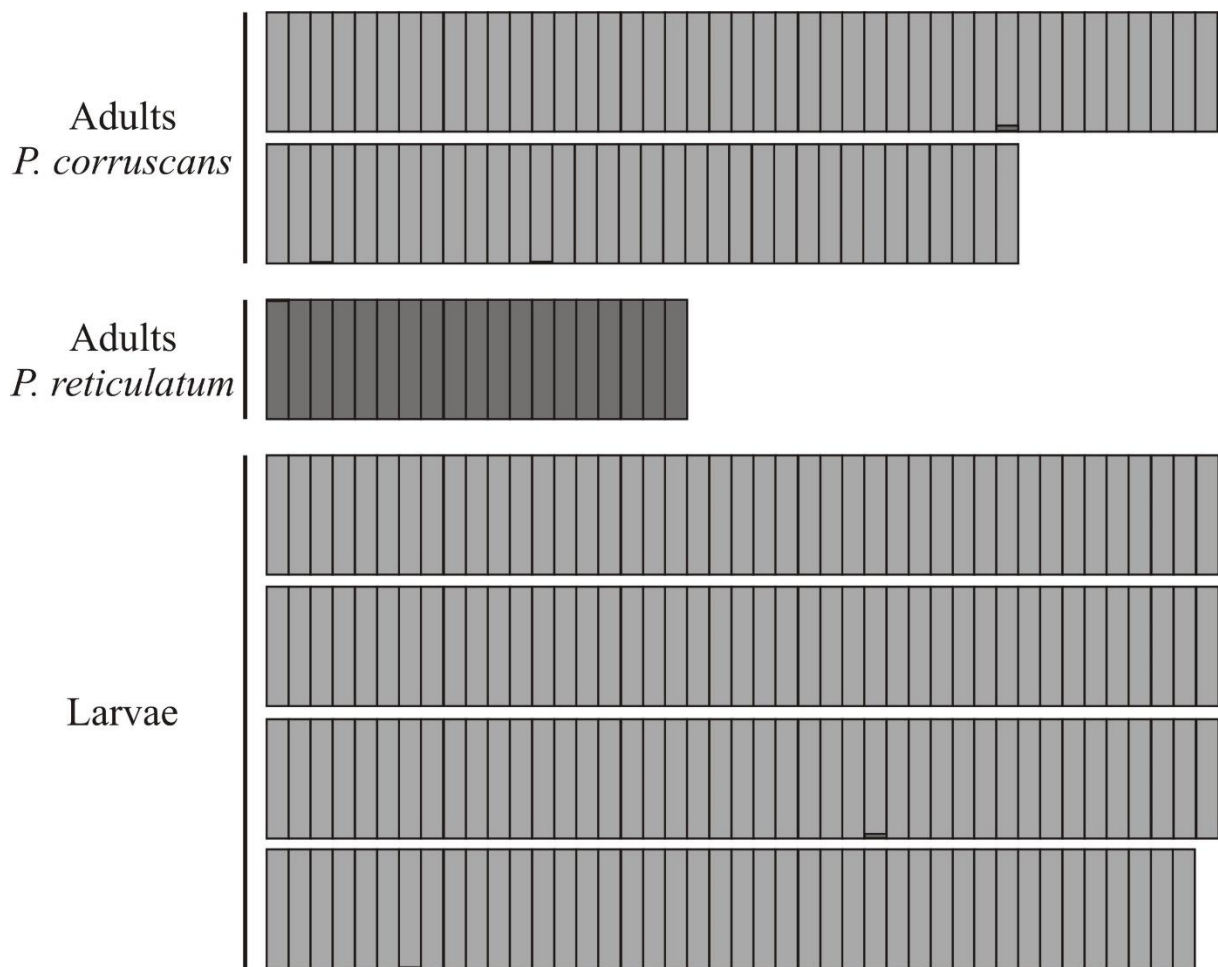


Figure 1. Genetic assignment of adults of *P. corruscans* and *P. reticulatum* and larvae sampled in the Upper Paraná River basin. Each column represent an individual and each color represent a species.

The number of alleles of larvae was 12.0 and genetic diversity was 0.61, with no evidence of inbreeding (Table 1). The assignment test supported that 99.8% of the genotype of the sampled larvae belongs to *P. corruscans*; 98.2% of the total of larvae presented more than 99% of its genotype assigned as *P. corruscans*; and no larvae had more than 4% of its genotype associated to *P. reticulatum* (Figure 1). The assignment test with NewHybrids supports these results and all larvae presented more than 99.7% of probability of belonging to *P. corruscans*.

Among the 75 adults of *P. corruscans* and the 171 larvae sampled in the Upper Paraná River basin, no individual presented mitochondrial DNA compatible with *P. reticulatum* nor evidence of hybridization and introgression in the nuclear DNA with this species.

Natural populations of *P. corruscans* and *P. reticulatum* occur in sympatry in some river basins (e.g. Paraguay River, Lower Paraná River, Uruguay River) but they present low level of natural hybridization (CARVALHO et al. 2013). This fact can be a consequence of differences in growth and body size of sexual maturation (RESENDE et al. 1996, GODINHO et al. 2007), as well as fidelity to the reproductive area, as proposed for *P. corruscans* by PEREIRA et al. (2009) (PRADO et al. 2012a). Alternatively, elevated proportions of hybrids were reported in regions with high density of fish farms that produce these hybrids, such as the Mogi Guaçu River (50% - Paraná River basin), the Ivinheima River (61% - Paraná River basin), and the Aquidauana River (30.75% - Paraguay River basin) (PRADO et al. 2012a, VAINI et al. 2014). Most of the hybrids sampled by Vaini et al. (2014) in the Upper Paraná River basin and Paraguay basin correspond to “*Cachapinta*”, which is also the most traded hybrid in fish farms (PORTO-FORESTI et al. 2011, PRADO et al. 2012a, VAINI et al. 2014). Furthermore, hybrids have already been collected in low frequency (3.6%) in an upper stretch of the Upper Paraná River, close to Ilha Solteira Dam, between 2003 and 2008 (PRADO et al. 2012a). During the period of these studies, Silva (personal communication) reported that hybrids were frequently caught in professional fisheries in the stretch of Upper Paraná River between Itaipu reservoir and Porto Primavera dam.

Alternatively, our results indicate an absence of any signal of hybridization and introgression in the larvae and adults of the native population of *P. corruscans* from the Upper Parana River basin, including in the Ivinheima River population, the sub basin that presented hybrids in the study of Vaini et al. (2014). Supported also by the currently sporadic catch of hybrids in this region (Rosa, personal communication; Silva, personal communication; VAINI et al. 2014), we suggest that the capture of hybrids in this region are most likely the outcome of escapes from local fish farms, supporting the hypothesis of BIGNOTTO et al. (2009) and PRADO et al. (2012a).

To assess future possibility of natural hybridization between *P. corruscans* and *P. reticulatum* in the Upper Paraná River basin, we recommend that studies using molecular markers in larvae of *P. corruscans* are applied systematically, in a monitoring program. Continuous or sporadic escapes from

aquaculture farms represent a risk of introduction of hybrid specimens into the natural waters by increasing propagule pressure (see SIMBERLOFF 2009 for details). Thus, monitoring is a fundamental tool for conservation of natural populations of the *pintado*. The use of larvae as the focus of the monitoring allows an approximation of the origin (e.g. tributaries contributing to escapes or areas of hybridization) of hybrids detected in the Upper Paraná River. Specific control campaigns may be directed to fish farms located in those tributaries. This approach is promising and can be used to prospect hybrids of other species along Neotropical basins.

We acknowledge A. B. SILVA, E. A. ROSA, V.A. TEIXEIRA, V. CAPATTI, W.M. DOMINGUES and R. PULZATTO NETO for the help with the sampling, A.L.J FERRAZ for provide pure *P. reticulatum* individuals. This study was funded by the Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, process numbers 478629/2012-5, 483324/2012-4 and 405623/2012-7. WAB is research fellows of the CNPq.

Literature cited

ALLENDORF F, LEARY R, SPRUELL P, WENBURG J. (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology and Evolution** **16**: 613-622. doi:10.1016/S0169-5347(01)02290-X.

ANDERSON E, THOMPSON EA. (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. **Genetics** **160**: 1217–1229.

BIGNOTTO TS, PRIOLI AJ, PRIOLI SMAP, MANIGLIA TC, BONI TA, LUCIO LC, GOMES VN, PRIOLI RA, OLIVEIRA AV, JULIO-JUNIOR HF, PRIOLI LM. (2009) Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Brazilian Journal of Biology** **69**: 681–689. doi: 10.1590/S1519-69842009000300022.

BUITRAGO-SUÁREZ UA, BURR BM. (2007) Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Blecker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa** **1512**: 1-38.

CARVALHO DC, OLIVEIRA DAA, BEHEREGARAY LB, TORRES RA. (2012) Hidden genetic diversity and distinct evolutionary significant units in an commercially important Neotropical apex predator, the catfish *Pseudoplatystoma corruscans*. **Conservation Genetics** **13**: 1671:1675. doi: 10.1007/s10592-012-0402-6.

CARVALHO DC, SEERIG AS, BRASIL BSAF, CREPALDI DV, OLIVERIA DAA. (2013) Molecular identification of the hybrid between the catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* using a set of eight microsatellite markers. **Journal of Fish Biology** **83**: 671–676. doi: 10.1111/jfb.12194.

EARL DA, VONHOLDT BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources** **4**: 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Molecular Ecology** **14**: 2611-2620. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

EXCOFFIER L, LISCHER HEL. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** **10**: 564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.

- FERNANDES R, GOMES LC, AGOSTINHO AA. (2003) Pesque-pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas? **Acta Scientiarum: Biological Sciences** **25**: 115-120. doi: 10.4025/actascibiolsci.v25i1.2089.
- GODINHO HP (2007). Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. **31**: 351–360.
- HASHIMOTO DT, PRADO FD, SENHORINI JA, FORESTI F, PORTO-FORESTI F. (2012) Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. **Aquaculture Research** **44**: 1-9. doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03092.x.
- HEBERT PDN, CYWINSKA A, BALL SL, DEWAARD JR. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. **Proceeding of the Royal Society of London** **270**: 313-321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.
- IVANOVA NV, ZEMLAK TS, HANNER RH, HEBERT PDN (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes** **7**: 544-548. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x.
- OLDEN JD, POFF NL, DOUGLAS MR, DOUGLAS ME, FAUSCH KD (2004) Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. **Trends in Ecology and Evolution** **19**: 18-24. doi: 10.1016/j.tree.2003.09.010.
- NAKATANI K, AGOSTINHO AA, BAUMGARTNER G, BIALETZKI A, SANCHES PV, MAKRAKIS MC, PAVANELLI CS (2001) **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá, EDUEM, XVIII+378 p.
- NARUM S.R. (2006) Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. **Conservation Genetics** **7**: 783-787. doi: 10.1007/s10592-005-9056-y.
- PEREIRA LHG, FORESTI F, OLIVEIRA C. (2009) Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. **Ecology of Freshwater Fish** **18**: 215–225. doi: 10.1111/j.1600-0633.2008.00338.x.
- PETRERE Jr. M, AGOSTINHO AA, OKADA EK, JULIO JR. HF. (2002) Review of the fisheries in the Brazilian portion of the Paraná/Pantanal basin, p. 123-143. In Cowx IG. **Management and Ecology of Lake and Reservoir Fisheries**. Oxford, Fishing News Books, XI+414p.
- PORTO-FORESTI F, HASHIMOTO DT, ALVES AL, ALMEIDA RBC, SENHORINI JA, BORTOLOZZI J, FORESTI F (2008) Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology** **31**: 195-202.

PORTO-FORESTI F, HASHIMOTO DT, PRADO FD, SENHORINI JA, FORESTI F (2011) A hibridação interespecífica em peixes. **Panorama da Aquicultura** **126**: 28-33.

PRADO FD, HASHIMOTO DT, SENHORINI JA, FORESTI F, PORTO-FORESTI F (2012a) Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. **Journal of Fisheries Research** **125**: 300–305. doi: 10.1016/j.fishres.2012.02.030.

PRADO FD, NUNES TL, SENHORINI JA, BORTOLOZZI J, FORESTI F, PORTO-FORESTI F (2012b). Cytogenetic characterization of F1, F2 and backcross hybrids of Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *P. reticulatum* (Pimelodidae: Siluriformes). **Genetics and Molecular Biology** **35**: 57-64. doi: 10.1590/S1415-47572012005000010.

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** **155**: 945-959.

RATNASINGHAM S, HEBERT PDN. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes** **7**: 355-364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x.

RESENDE EK, CATELLA AC, NASCIMENTO FL, PALMEIRAS SS, PEREIRA RAC, LIMA MS, ALMEIDA VLL (1996) **Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*): pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda: Pantanal do Mato Grosso do Sul**. Corumbá, EMBRAPA – CPAP, Boletim de Pesquisa 02, 75p.

REVADALVES E, PEREIRA LHG, FORESTI F, OLIVEIRA C (2005) Isolation and characterization of microsatellites loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes** **5**: 462-465. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.00883.x.

RHYMER JM, SIMBERLOFF DS (1996) Extinction by hybridization and introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics** **27**: 83–109. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83.

SANZ N, ARAGUAS RM, FERNÁNDEZ R, MANUEL V, GARCÍA-MARÍN J-L (2009) Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. **Conservation Genetics** **10**: 225-236. doi: 10.1007/s10592-008-9550-0.

SIMBERLOFF DS (2009) The Role of Propagule Pressure in Biological Invasions. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** **40**: 81-102. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120304.

SCRIBNER Kt, PAGE Ks, BARTRON ML (2001) Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** **10**: 293-323. doi: 10.1023/A:1016642723238.

VÄHÄ JP, PRIMMER C (2006) Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. **Molecular Ecology** **15**: 63–72. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02773.x.

VAINI JO, GRISOLIA AB, PRADO FD, PORTO-FORESTI F (2014). Genetic identification of interspecific hybrid of Neotropical catfish species (*Pseudoplatystoma corruscans* vs. *Pseudoplatystoma reticulatum*) in rivers of Mato Grosso do Sul State: Brazil. **Neotropical Ichthyology** **12**: 635-641. doi: 10.1590/1982-0224-20130169.

VAN OOSTERHOUT C, HUTCHINGSON WF, WILLS DPM, SHIPLEY P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes** **4**: 535–538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.

WALTHER GR, ROQUES A, HULME PE, SYKES MT, PYSEK P, KUHN I, ZOBEL M, BACHER S, BOTTA-DUKÁT Z, BUGMANN H, CZÚCZ B, DAUBER J, HICKLER T, JAROSÍK V, KENIS M, KLOTZ S, MINCHIN D, MOORA M, NENTWIG W, OTT J, PANOV VE, REINEKING B, ROBINET C, SEMENCHENKO V, SOLARZ W, THUILLER W, VILÀ M, VOHLAND K, SETTELE J (2009) Alien species in a warmer world: risks and opportunities. **Trends in Ecology and Evolution** **24**: 686–693. doi: 10.1016/j.tree.2009.06.008.

WELCOMME RL (1985) **River fisheries**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO: 330 p.

Supplementary data 1. Sampling points, number of adults *Pseudoplatystoma corruscans* (Pc) and *P. reticulatum* (Pr), and larvae of *Pseudoplatystoma* spp. (LP) sampled.

Sampling point	Pc	Pr	LP	Coordinate
Ivinheima River	26	0	47	22°48'00"S / 53°32'00"O
				22°47'42"S / 53°32'42"O
				22°47'40"S / 53°32'14"O
				22°50'60"S / 53°34'30"O
				22°49'22"S / 53°33'10"O
				22°55'54"S / 53°39'11"O
				22°56'46"S / 53°38'33"O
Ivinheiminha River	0	0	2	23°14'00"S / 53°43'24"O
Amambai River	26	0	62	22°59'12"S / 53°38'56"O
				23°20'20"S / 53°51'24"O
				23°21'28"S / 53°53'04"O
Ivaí River	5	0	57	23°20'20"S / 53°51'29"O
				23°15'01"S / 53°38'18"O
				23°16'20"S / 53°37'58"O
				23°17'17"S / 53°39'42"O
				23°18'00"S / 53°41'32"O
Iguatemi River	10	0	0	23°15'05"S / 53°37'58"O
				23°55'38"S / 54°11'22"O
				23°55'37"S / 54°10'45"O
				23°55'27"S / 54°11'24"O
				23°55'21"S / 54°11'15"O
Piquiri River	8	0	0	23°55'38"S / 54°11'22"O
				23°55'29"S / 54°11'39"O
				24°01'47"S / 54°02'53"O
Paraná River	0	0	3	24°01'52"S / 54°04'33"O
				24°01'51"S / 54°02'48"O
				23°40'18"S / 54°03'47"O
				23°26'09"S / 53°58'00"O
				23°38'51"S / 53°56'44"O
				22°39'02"S / 53°05'26"O
				22°45'39"S / 53°19'41"O
				23°14'18"S / 53°43'04"O
				22°53'41"S / 53°38'41"O
				23°21'52"S / 53°52'48"O
				23°55'28"S / 54°09'17"O
23°18'12"S / 53°41'54"O				
Aquidauana River	0	20	0	24°01'24"S / 54°05'33"O
				23°38'51"S / 53°56'44"O
				24°01'06"S / 54°10'10"O
				24°00'58"S / 54°10'37"O
Aquidauana River	0	20	0	23°48'50"S / 53°59'53"O
Aquidauana River	0	20	0	20°28'53"S / 55°47'56"O

CAPÍTULO IV

Avaliando o impacto de barragens sobre a genética de peixes que realizam *homing* com modelo baseado em indivíduos

Rafael A. Baggio^{1,2,3}, Sabrina S. L. Araujo^{1,3,4}, Walter A. Boeger^{1,2,3}

¹ Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim, Curitiba, Paraná, Brazil. CEP 81531-970.

² Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim, Curitiba, Paraná, Brazil. CEP 81531-970.

³ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim, Curitiba, Paraná, Brazil. CEP 81531-970.

⁴ Departamento de Física, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19044, Curitiba, PR 81531–980, Brazil

Autor correspondente: Rafael A. Baggio. rbaggio@ufpr.br / rbaggioufpr@gmail.com. Laboratório de Ecologia Molecular, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Francisco H. dos Santos s/n, Jardim das Américas, CEP 81531-980, Caixa Postal 19073, Curitiba, Paraná, Brazil. +55 41 33611765.

- Artigo formatado para ser publicado na revista *Conservation Genetics*.

Resumo

Apesar de potencialmente prejudiciais, poucos estudos avaliaram a frequência de impacto de barragens sobre a distribuição da diversidade genética de peixes neotropicais. Contudo, os impactos desses empreendimentos devem afetar diferentemente a estrutura genética de espécies com características biológicas distintas. Nesse trabalho, é hipotetizado que espécies que realizam *homing*, comportamento que parece comum em bagres e espécies de *Prochilodus*, são afetadas mais severamente pela construção de barragens em rios Neotropicais, uma vez que, quando seu fechamento, indivíduos devem ficar isolados de seus sítios de reprodução originais. Assim, esses indivíduos se reproduzirão nos tributários mais próximos à barragem, sendo incorporados no *pool* reprodutivo desses tributários, gerando homogeneização genética entre essas populações. Para testar essa hipótese, é proposto um modelo matemático que simula o impacto da barragem permeáveis e impermeáveis sobre a distribuição da estrutura genética de populações que realizam *homing* a curto e a longo prazo. Os resultados das simulações suportam a homogeneização genética dessas populações, especialmente entre aquelas adjacentes à barragem, mesmo na primeira geração. A longo prazo (após 100 períodos reprodutivos), as simulações suportam o maior impacto de barragens permeáveis, tanto com dispersão assimétrica quanto simétrica. Alternativamente, a diferenciação genética entre as populações é reestabelecida a longo prazo quando as barragens são impermeáveis. Dessa forma, medidas de conservação e manejo devem ser tomadas para evitar a homogeneização genética em populações que realizam *homing* a curto prazo, e para reestabelecimento da estrutura genética das populações a longo prazo.

Palavras-chave: Modelos matemáticos, homogeneização genética, simulações matemáticas, peixes neotropicais, peixes migradores.

Introdução

Apesar dos benefícios econômicos e sociais, os impactos de barragens sobre os sistemas naturais são geralmente bastante severos. Para espécies de peixes, as barragens e seus reservatórios alteram as características bióticas e abióticas do ecossistema (Mérona et al. 2001, 2003; Albrecht e Pellegrini-Caramaschi 2003; Loureiro-Crippa e Hahn 2006), e eliminam ambientes naturais (e.g. áreas de desova de espécies migradoras, Baumgartner et al. 2004). Além disso, as barragens em si constituem barreiras físicas ao movimento de organismos aquáticos, influenciando os padrões de migração das espécies (Gosset et al. 2006), fragmentando (Heggenes e Røed 2006; Clarke et al. 2007; Horreo et al. 2011) e alterando o fluxo gênico entre populações (Paiva et al. 2006; Pamponet et al. 2008).

A impossibilidade de realizar migrações e a fragmentação populacional são especialmente preocupantes para a manutenção da diversidade genética de espécies de peixes (Heggenes e Røed 2006). Populações fragmentadas podem ter o tamanho efetivo populacional reduzido, com consequente redução da diversidade e diferenciação genética entre populações (Heggenes e Røed 2006). Todas essas consequências combinadas podem reduzir o potencial evolutivo de espécies e até mesmo causar extinção de populações (Neraas e Spruell 2001; Jager et al. 2001a, b, 2006, 2007, 2010; Morita e Yokota 2002; Fagan et al. 2002, 2005).

Alguns estudos têm sido realizados para testar o efeito da fragmentação populacional causada por barragens artificiais sobre a diversidade genética de peixes dulcícolas neotropicais (e.g. Hatanaka et al. 2006; Carvalho-Costa et al. 2008; Barroca et al. 2012; Sanches et al. 2012; Pil et al. dados não publicados). Esses estudos, em sua maioria, não têm detectado diferenciação genética entre as populações. A ausência de estruturação genética tem sido explicada como uma consequência do longo tempo de geração de algumas espécies (e.g. Sanches et al. 2012), da passagem de larvas e juvenis através da barragem (e.g. Alò e Turner 2004) e do grande tamanho efetivo populacional (e.g. Pil et al. dados não publicados), mecanismos que retardam ou evitam a diferenciação entre as populações esperada devido ao efeito da deriva genética (Wright 1931; Slatkin 1995; Holsinger e Weir 2009). Entretanto, populações que realizam *homing* podem ter respostas diferentes do que espécies sedentárias ou as demais espécies migradoras (que não realizam *homing*).

O comportamento de *homing* em peixes é definido como o retorno dos indivíduos ao sítio de reprodução natal para reprodução em detrimento a outros locais igualmente prováveis (Gerking 1959). Em espécies dulcícolas, espera-se que as populações que se reproduzem em cada sítio de reprodução (tributário) apresentem diferenciação genética entre si (*demes*)

devido aos efeitos de deriva genética e adaptação local (Hansen et al. 2002, 2007), com mistura das populações nas áreas de alimentação (i.e. partes baixas dos tributários e calha principal da bacia), gerando um padrão dendrítico de estrutura genética (Bouza et al. 1999; Primmer et al. 2006; Wollebæk et al. 2011; Östergren et al. 2012, Baggio et al. Cap. II).

Compreender a extensão e o contexto dos impactos de barragens sobre a diversidade genética de populações de peixes que realizam *homing* é essencial para embasar programas de mitigação que busquem a manutenção de espécies de peixes neotropicais e de outras regiões do mundo. Estudos sugerem que diversas espécies de peixes Neotropicais, Siluriformes e Characiformes, realizam *homing* (Godoy 1959, 1975; Batista e Alves-Gomes 2006; Godinho e Kynard 2006, 2008; Godinho et al. 2007; Abreu et al. 2009; Pereira et al. 2009; Batista 2010; Rueda et al. 2013; Carvajal-Vallejos et al. 2014; Baggio et al. Cap. II), e a perda de diversidade e estrutura genética de populações dessas espécies pode ser bastante prejudicial, com a possível perda de adaptação local e da capacidade de responder a alterações ambientais (Olden et al. 2004).

Baggio et al. (Cap. II) sugerem que o padrão de distribuição da diversidade genética de *Pseudoplatystoma corruscans* em um trecho do Alto Rio Paraná pode estar associado ao comportamento de *homing*. Contudo, esses autores postulam que a ausência de estruturação genética observada para *demes* de tributários próximos à UHE de Porto Primavera, na calha principal do Rio Paraná, seja decorrente de homogeneização genética associada a alterações nos padrões de migração e reprodução decorrentes da represa. Para testar essa hipótese, o presente estudo utiliza um modelo baseado em indivíduo para simular a evolução de populações de espécies de peixes que realizam *homing* sob o impacto de barramento na calha principal da bacia. Diferentes modelos têm sido utilizados para testar o impacto de barragens sobre populações de peixes (e.g. Jager, 2001a,b, 2006; Marteleto 2015), mas nenhum deles considerou espécies que realizam *homing*. Assim, o modelo desenvolvido busca responder quatro importantes questões: a) Populações que realizam *homing* podem apresentar homogeneização genética como resultado de isolamento de indivíduos dos seus sítios de reprodução por barragens? b) Em quantas gerações seriam detectadas nessas alterações? c) Qual o impacto a longo prazo das barragens sobre essas populações? d) Qual o impacto da permeabilidade da barragem para essas populações?

Materiais e Métodos

O modelo matemático desenvolvido para avaliar o impacto de barragens sobre populações de peixes que realizam *homing* é baseado em indivíduos (IBM) e compreende 2 partes. Primeiramente, no modelo **Homing**, são simulados cenários de estrutura genética esperados para populações que realizam *homing*: diferenciação genética entre as populações de cada tributário (*demes*) e mistura de populações na calha principal do rio (Figura 1A). No Modelo **Barragem**, a partir dos cenários simulados pelo modelo Homing (cenário inicial) e de seus parâmetros, uma barragem é adicionada ao sistema.

Segundo a hipótese de Baggio et al. (Cap. II), a barragem isola alguns indivíduos de seus tributários de origem e impossibilita o seu retorno ao seu sítio de reprodução original (Figura 1B). Esses indivíduos se reproduzem nos tributários mais próximos das barragens e se hibridizam com populações originalmente distintas geneticamente dos tributários próximos da barragem (Figura 1C). Como as populações desses dois tributários recebem um grande aporte de dispersores provenientes das mesmas populações de origem (populações que se reproduziam no outro trecho), espera-se que as populações adjacentes aos reservatórios se homogeneizem geneticamente (Figura 1D).

O modelo Barragem permite, ainda, avaliar o efeito da barragem sobre a estrutura genética das populações sob diferentes níveis e padrões de permeabilidade: impermeável ou permeáveis nos sentidos montante (adultos que dispersam para montante através de escadas), jusante (ovos, larvas e adultos que dispersam para jusante através das turbinas, vertedouros ou escadas), ou ambos. A redução da diferenciação genética é testada através das variações dos valores de F_{st} global e pareados (entre cada população) ao longo dos períodos reprodutivos, antes e após a adição da barragem.

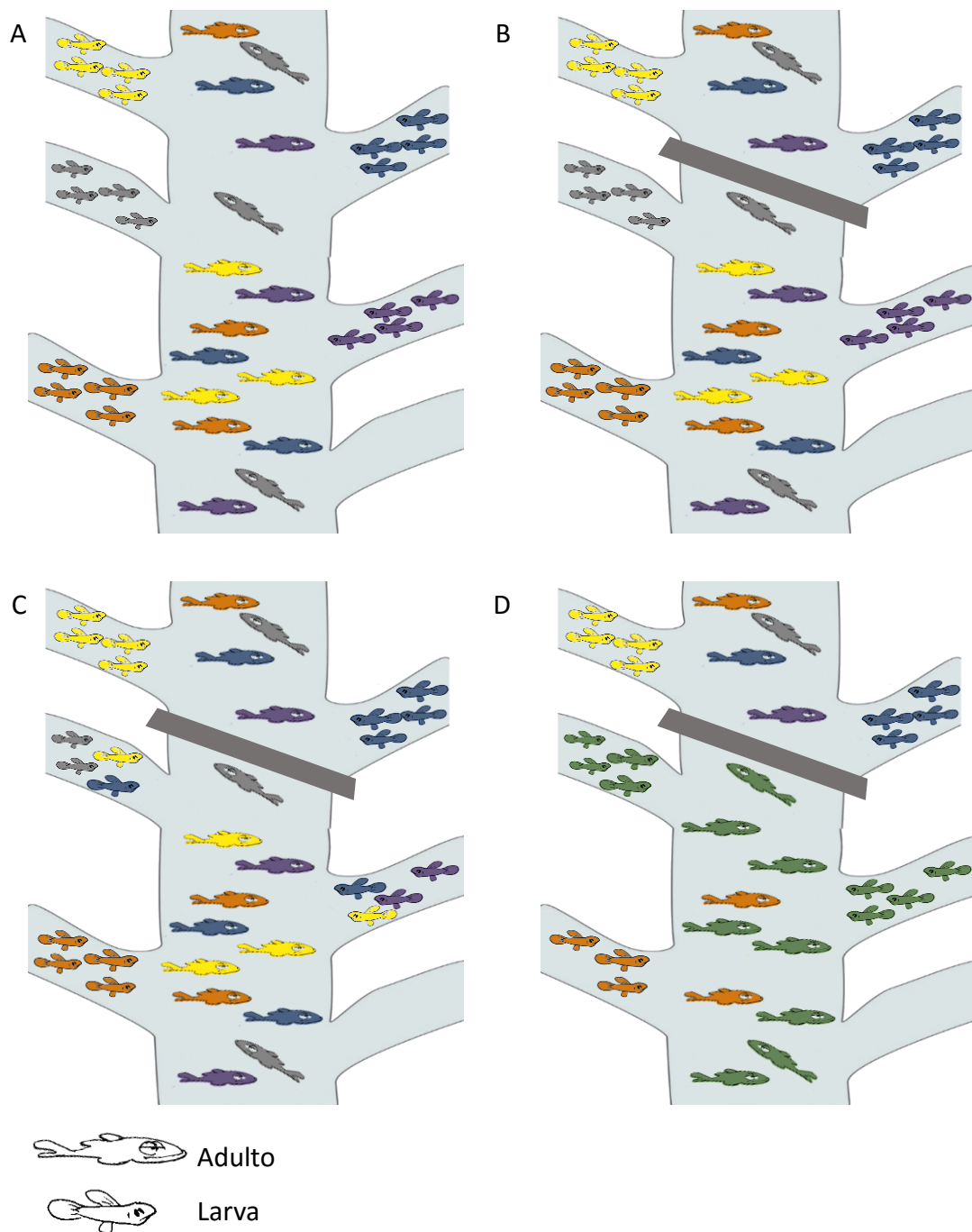


Figura 1. Representação gráfica do cenário hipotetizado por Baggio et al. (Cap. II) a ser testado através modelos matemáticos nesse estudo. Indivíduos de diferentes cores representam populações geneticamente distintas. Larvas representam as populações que se reproduzem em cada tributário (*demes*). 1A: Padrão dendrítico de estrutura genética com mistura das populações na calha principal esperado para populações que realizam *homing*. 1B: Isolamento de indivíduos (dispersores) de seus sítios de reprodução devido a construção de uma barragem. 1C: Hibridização das populações próximas às barragens com os dispersores. 1D: Homogeneização genética esperada devido a hibridização de populações geneticamente distintas com os dispersores dos mesmos *demes*.

Modelo Homing

O Modelo Homing (Fig. 2) simula a dinâmica de distribuição espacial de indivíduos e populações que realizam *homing* ao longo de um rio hipotético dividido em L tributários, cada qual representando uma área de reprodução (i.e. um tributário). Cada indivíduo se reproduz em um tributário e, uma vez que a área de alimentação não influencia o local no qual o indivíduo irá se reproduzir, apenas os sítios de reprodução são explicitamente modelados.

Em populações que realizam *homing*, espera-se que as áreas de desenvolvimento e alimentação sejam as mesmas para todas as populações, estando elas sujeitas às mesmas pressões de predação e disponibilidades de recursos, o que limita o tamanho máximo populacional das populações como um todo. Assim, um valor máximo populacional é escolhido para o todo o sistema (t - tamanho populacional máximo total).

Cada indivíduo é caracterizado por seu genoma e sua posição espacial (tributário no qual irá se reproduzir). O conteúdo genético (genoma) é composto por uma sequência haploide binária (alelos 0 e 1) com g loci. Esse genoma é considerado como um marcador neutro, pois seleção natural não age sobre as diferentes posições. As condições iniciais são geradas com a criação de t indivíduos e o sorteio de seu tributário de origem e de seu genoma – o tributário e os alelos de cada locus do genoma de cada indivíduo são definidos aleatoriamente.

Dada as condições (t indivíduos em suas posições espaciais e com seu genoma) e os parâmetros iniciais (número de tributários e taxas de dispersão, mutação e mortalidade), inicia-se a dinâmica na qual cada indivíduo pode dispersar, morrer e se reproduzir, nessa ordem, de acordo com suas probabilidades, por n gerações.

Inicialmente, os indivíduos têm uma probabilidade de dispersar para outro sítio de reprodução (tributário), definida por uma taxa de dispersão (d). Essa taxa de dispersão corresponde a erros no comportamento de *homing* de alguns indivíduos, quando esses se reproduzem em um tributário diferente daquele que nasceu. A partir do momento que um indivíduo dispersa, ele permanecerá no novo tributário nas próximas gerações, exceto se ocorrer uma nova dispersão (erro no *homing*). Após todos os indivíduos terem a oportunidade de dispersar, cada indivíduo poderá morrer independentemente de seu genoma (não há seleção ambiental sobre os loci, como descrito acima), a uma probabilidade d . Em seguida, os indivíduos sobreviventes têm a oportunidade de se reproduzir.

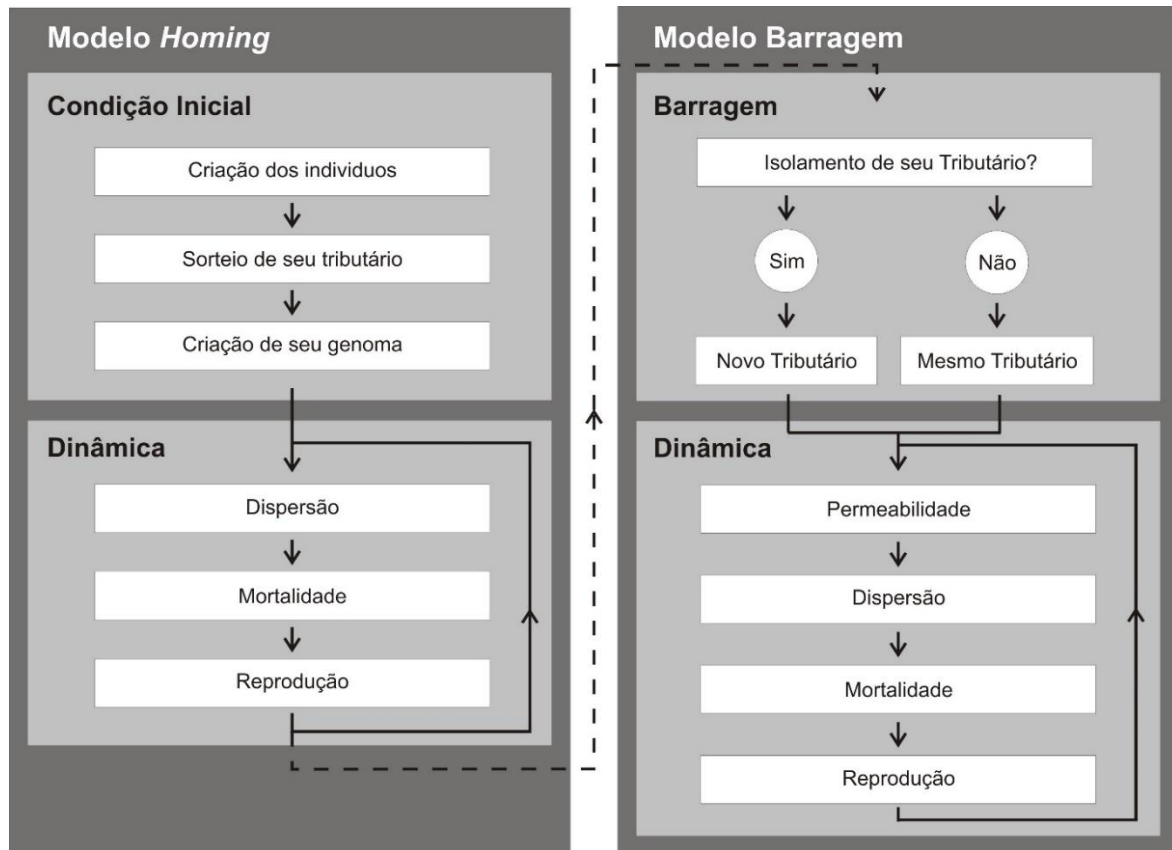


Figura 2. Fluxograma de funcionamento dos modelos Homing e Barragem. No primeiro, são criados os indivíduos, sorteados seus tributários e criado seu genoma (condição inicial). A dinâmica ocorre em ciclos de dispersão, mortalidade e reprodução, por n gerações. Esse cenário é usado como dado de entrada do modelo Barragem, quando uma barragem é adicionada ao sistema e os indivíduos podem ficar isolados ou não de seu tributário. Se ficarem isolados, se reproduzirão nos 2 tributários adjacentes a barragem, caso contrário, manterão em seu tributário de reprodução. A partir disso, novos ciclos de dispersão, mortalidade e reprodução ocorrem, com possibilidade de indivíduos dispersarem para jusante, montante ou em ambos os sentidos (permeabilidade) através da barragem.

A reprodução ocorre se o tamanho populacional total (soma das populações dos tributários) estiver abaixo de seu valor máximo (capacidade de suporte). Os indivíduos são considerados hermafroditas, a escolha dos indivíduos que irão se reproduzir ocorre aleatoriamente e cada indivíduo pode se reproduzir até 2 vezes em cada geração. Cada descendente, limitado a um por cruzamento, herdará 50% de seu genoma de cada progenitor, definidos aleatoriamente, de forma que os *loci* evoluem independentemente (*loci* não ligados). Durante a reprodução, mutações podem ocorrer a uma taxa μ . Entre cada período reprodutivo, portanto, o tamanho populacional é atualizado pela soma dos indivíduos sobreviventes com os seus descendentes. A cada z gerações, valores de F_{st} global e pareados são estimados pelo método de Weir e Cockerham (1984) e Weir (1996).

Modelo Barragem

A partir da simulação do padrão de estrutura genética esperada para populações que realizam *homing* gerado no modelo Homing, o modelo Barragem cria uma barragem que limita o fluxo genético entre as populações a sua montante e jusante (Fig. 2). Para isso, o cenário simulado no modelo Homing (indivíduos, tributários de reprodução, genomas e parâmetros) é utilizado como dado de entrada para o modelo Barragem. A barragem é criada à jusante do tributário b , dividindo o sistema em dois trechos (montante e jusante). Nesse momento, partindo do pressuposto que durante o período de alimentação os indivíduos estão aleatoriamente distribuídos ao longo de todo o sistema, independentemente de sua área de reprodução, cada um pode estar à montante ou à jusante da barragem quando da sua introdução. A probabilidade de um indivíduo ficar à montante ou à jusante da barragem é definida pela proporção do rio situado em cada um dos trechos. Assim, a chance de um indivíduo ficar à montante da barragem (b_up) é:

$$b_up = \frac{b}{L},$$

sendo b o tributário a montante da barragem e L o número total de tributários E à jusante (b_down):

$$b_down = 1 - b_up.$$

Os indivíduos que ficarem no mesmo trecho de seu tributário de reprodução continuarão a se reproduzir no mesmo tributário. Alternativamente, aqueles que ficarem isolados de sua área de reprodução pela barragem irão se reproduzir em um dos dois tributários adjacentes a ela, com iguais probabilidades: os indivíduos que originalmente se reproduziam à jusante e ficaram isolados à montante da barragem se reproduzirão em um dos dois tributários à montante adjacentes à barragem; aqueles que se reproduziam à montante da barragem e ficaram isolados à jusante se reproduzirão em um dos dois tributários à jusante mais próximos da barragem.

Nesse modelo, o tamanho máximo populacional após a adição da barragem é dividido entre os dois trechos (montante e jusante), proporcional ao tamanho de cada um e cuja soma é o tamanho máximo populacional para todo o rio antes da barragem (t). Assim, o tamanho máximo populacional à montante (t_up) é definido como:

$$t_up = t * \frac{b}{L},$$

sendo b o tributário a montante da barragem e L o número total de tributários. O tamanho populacional máximo a jusante (t_down) é definido como:

$$t_{down} = t - t_{up}.$$

A partir da inserção da barragem, a dinâmica de dispersão, mortalidade e reprodução recomeça por n gerações, com possibilidade da barragem ser impermeável ou permeável (probabilidade p de um indivíduo dispersar para o outro trecho do rio) sentidos jusante, montante ou ambos. A dispersão dos indivíduos através da barragem ocorre aleatoriamente, independentemente de seu sítio de reprodução. Assim, todos os indivíduos de um trecho têm a mesma chance de dispersar pela barragem. Os indivíduos que dispersarem através da barragem se reproduzirão em um dos tributários adjacentes à barragem, da mesma forma daqueles que ficaram isolados de seu sítio de reprodução quando o fechamento da barragem. A cada z gerações, valores de F_{st} global e pareados são calculados, possibilitando avaliar como a estrutura genética das populações são afetadas pela adição da barragem

Parâmetros testados

Para testar a sensibilidade do modelo Homing aos diferentes parâmetros, foram realizadas simulações com valores dos parâmetros fixos, denominada “simulações padrão”, a partir das quais os valores de cada parâmetro foram alterados em simulações subsequentes para avaliar sua influência sobre os valores de F_{st} (Tabela 1). As simulações padrão foi realizada em 25 réplicas com 2000 gerações cada, em cenários com 5 tributários, tamanho máximo populacional total de 500 indivíduos, genoma com 500 *loci* e taxas de mutação de 0,1% por geração, de mortalidade de 10% e de dispersão de 1%. Os valores de F_{st} foram calculados a cada 10 gerações. Para avaliar o efeito da taxa de dispersão, os valores das simulações padrão foram mantidos, exceto para a taxa de dispersão, que variou entre 0,0%, 0,5%, 1,0%, 5,0%, 10,0%, 20,0% e 40,0%. Para o tamanho populacional máximo, os valores totais variaram de 250, 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 indivíduos. Para a mortalidade, as simulações foram realizadas com taxas de 10%, 20%, 30% e 40%. Para o teste do efeito da mutação, foram realizadas simulações com taxa de mutação de 0,01%, 0,10%, 1,00%, 5,00% e 10,00%. A influência desses fatores foi testada utilizando a média dos valores de F_{st} das gerações 1501 a 2000 (amostradas a cada 10 gerações), através de modelos lineares e, quando esse modelo não representava bem a variação dos dados ($R^2 < 0,30$), modelos não lineares, no software R. Duas *Path Analysis* (software R, pacote *plspm*) foram utilizadas para avaliar o efeito do conjunto de parâmetros sobre a estrutura genética das populações simuladas, uma com dados brutos e outra com eles linearizados, de acordo com os modelos que melhor explicaram o efeito de cada uma das variáveis (Tab. 1).

Tabela 1. Variação dos parâmetros avaliados no modelo Homing, e os modelos lineares e não lineares que melhor se ajustam à variação dos dados. Os valores de p são referentes à significância dos valores de “a” e “b” segundo as fórmulas “ $y = ax + b$ ” e “ $y = \frac{1}{ax+b}$ ”.

Parâmetros	Simulações Padrão	Variação dos Parâmetros	Modelo	R ² Ajustado	p a	p b
Taxa de Dispersão	1,0%	0,0%, 0,5%, 1,0%, 5,0%, 10,0%, 20,0%, 40,0%	$y = \frac{1}{1175 * x + 1,29}$	0,998	<0,0001	<0,0001
Tamanho Populacional Total	500	250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000	$y = \frac{1}{0,10 * x + 2,65}$	0,986	<0,0001	<0,0001
Taxa de Mutação	0,10%	0,01%, 0,10%, 1,00%, 5,00%, 10,00%	$y = -0,50 * x + 0,08$	0,949	<0,0001	<0,0001
Taxa de Mortalidade	10%	10%, 20%, 30%, 40%	$y = 0,65 * x + 0,01$	0,990	<0,0001	<0,0001

Impacto da barragem sobre populações que realizam homing

Para avaliar o efeito da barragem sobre a distribuição da diversidade genética das populações que realizam *homing*, a estrutura genética inicial foi gerada através de 10 simulações com 2000 gerações cada, seguindo os mesmos valores dos parâmetros das simulações padrão do modelo Homing, exceto pelo número de tributários ($L = 8$) e pelo tamanho populacional máximo total ($t = 800$). Valores de F_{st} global e pareados foram estimados para cada geração.

As barragens foram criadas à jusante do quarto tributário, separando o rio em 2 trechos com 4 tributários cada, nomeados de A até H no sentido jusante, alternando as margens (A, C, E, F representam tributários de uma margem e os demais da margem oposta). Foram realizadas 10 corridas (cada qual com respectivo cenário inicial) com 1000 gerações após a adição da barragem para cada permeabilidade: impermeável, permeável apenas para jusante a 5,0% de probabilidade, apenas para montante a 5,0% ou em ambos os sentidos (5,0% em cada sentido). A média dos valores de F_{st} para cada corrida foi comparada entre antes (gerações entre 1501 e 2000) e depois da adição da barragem, a curto (geração 2001, a 1ª geração após a adição da barragem) e a longo prazo (gerações 2100-3000, quando a maioria dos valores de F_{st} estabilizaram) através do teste t pareado no software R.

Para agrupar os indivíduos em suas respectivas populações genéticas e avaliar a homogeneização genética entre as populações, os dados dos genomas dos indivíduos gerados no cenário inicial (estrutura populacional anterior à adição da barragem, geração 2000) e nas 1ª e 100ª gerações após a adição da barragem (gerações 2001 e 2100 respectivamente) foram analisados no software Structure 3.3.1 (Pritchard et al. 2000) para cada permeabilidade, em corridas com 100 mil gerações (*burn-in* de 10 mil), em 3 replicatas com valores de K (número de agrupamentos testados) variando entre 1 e 9. Para a avaliação do valor de K que melhor representa as populações, inicialmente foi realizado um ranqueamento dos valores mais prováveis através do método de Evanno et al. (2005), implementado na ferramenta online Structure Harvester (Earl e vonHoldt 2012). Após isso, os valores de K que maximizassem a separação das populações reais em diferentes clusters foram escolhidos. Não foi escolhido o valor ótimo de K calculado pelo método de Evanno et al. (2005) uma vez que fatores como demografia (i.e. diferenças nos tamanhos populacionais) e processos históricos (i.e. perfis anteriores às barragens) tornam as estruturas genéticas das espécies complexas. Dessa forma, diferentes valores de K podem refletir diferentes processos demográficos e considerar mais de um valor ou valores subótimos de K possibilita avaliar a diferenciação genética tanto entre grupos de populações (e.g. grupos de populações à

montante e à jusante da barragem) como entre as populações dentro dos grupos (e.g. todas as populações entre si) (ver Meirmans 2015 para detalhes).

Resultados

Sensibilidade dos parâmetros para determinação da estrutura genética sob condições não impactadas

Os valores de F_{st} das simulações padrão do modelo Homing se estabilizaram aproximadamente em 200 gerações (Fig. 3), em valores médios de 0,077 (DV = 0,002). Similarmente, os valores de F_{st} das demais simulações (valores dos parâmetros variando de acordo com a tabela 1) se estabilizaram antes das 200 primeiras gerações, exceto quando a taxa de dispersão foi 0,0%, quando a estabilização ocorreu em torno de 1500 gerações. Assim, para as análises do efeito dos parâmetros sobre os valores de diferenciação genética entre as populações, foram utilizados os valores de F_{st} entre as gerações 1501 e 2000.

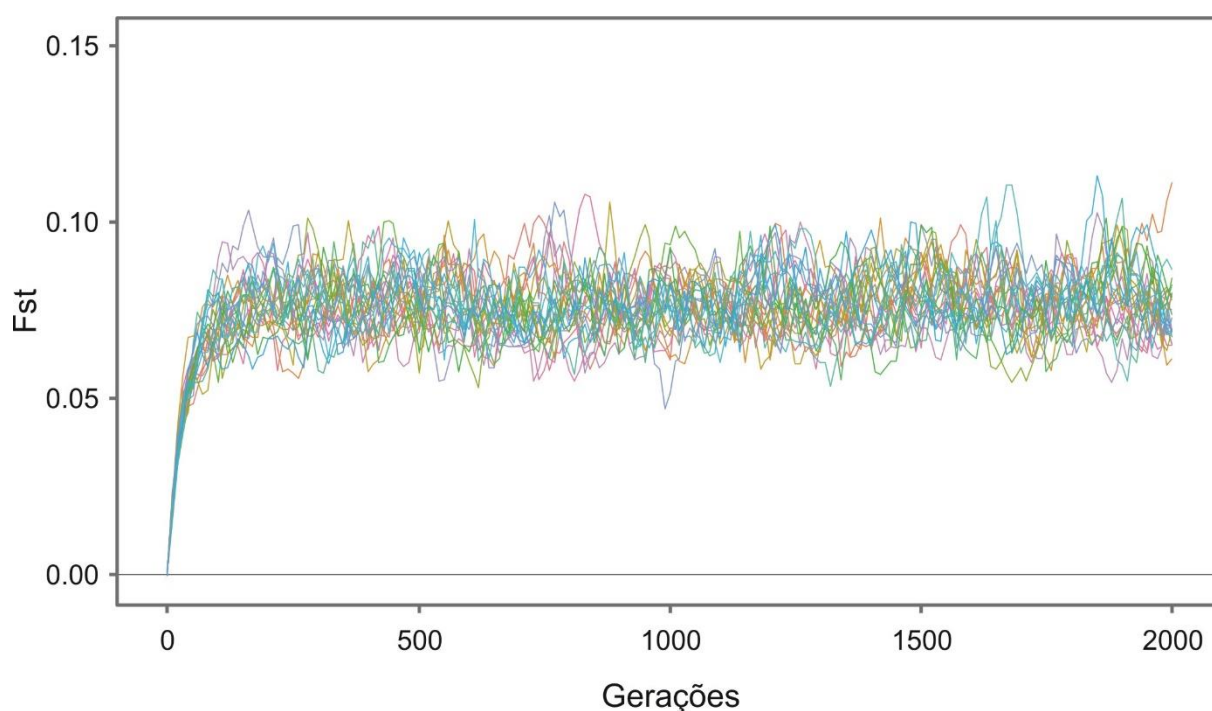


Figura 3. Variação dos valores de F_{st} em cada geração obtidos em 25 réplicas das simulações padrão (taxas de dispersão de 1%, de mutação de 0,1%, de mortalidade de 10%, tamanho populacional total de 500 indivíduos ao longo de 5 tributários).

Nas simulações com ausência de dispersão, algumas populações foram extintas, efeito da perda de indivíduos por morte maior do que a reposição por reprodução. Em casos mais extremos, apenas uma população sobreviveu.

Os modelos que melhor descrevem o relacionamento entre cada variável e os valores de Fst foram lineares para os parâmetros taxa de mortalidade e taxa de mutação e racionais para o tamanho populacional total e taxa de dispersão (Tab. 1, Fig. 4). Exceto a taxa de mortalidade, os parâmetros apresentaram correlação negativa com os valores de Fst.

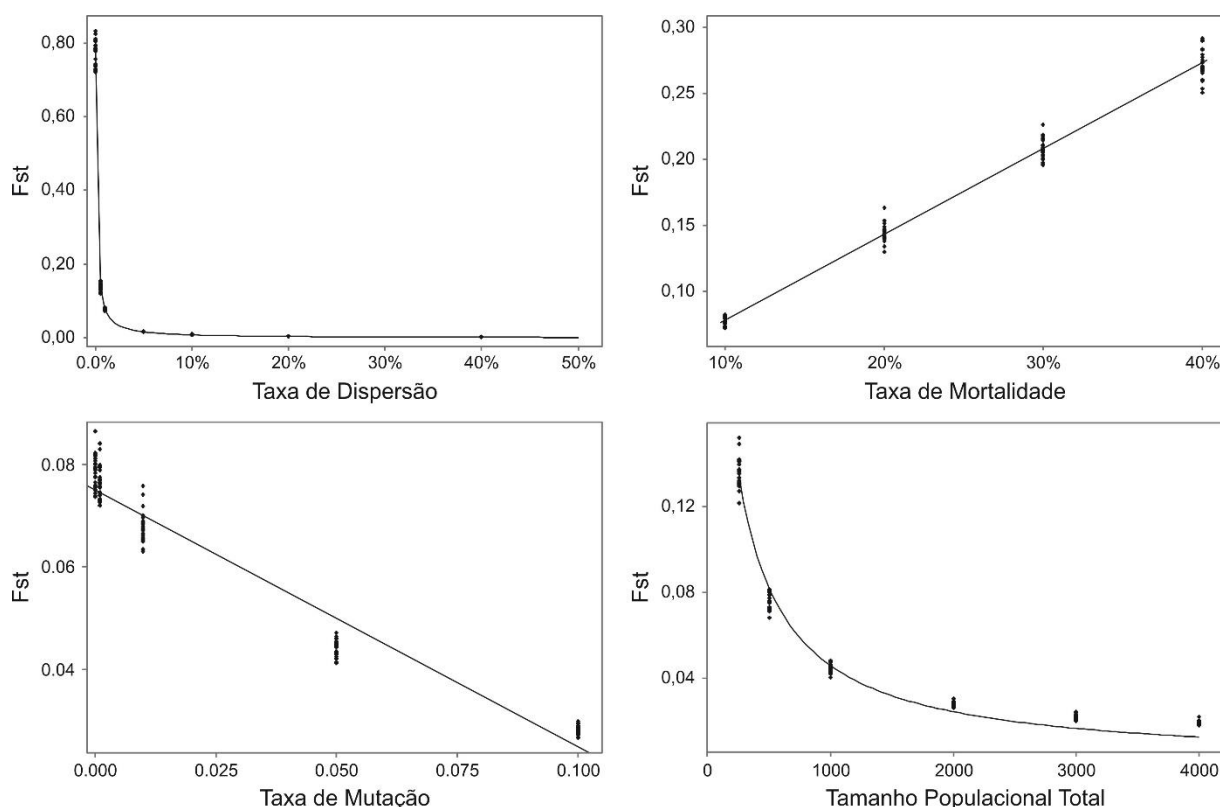


Figura 4. Variação dos valores de Fst obtidos a partir da variação dos valores dos parâmetros taxa de dispersão, taxa de mortalidade, taxa de mutação e tamanho populacional total, e os modelos linear e não linear que melhor representam essa variação. Observar que as escalas do eixo Fst variam entre os gráficos.

A *Path Analysis* suporta a influência conjunta dos parâmetros sobre os valores de Fst (Fig. 5). A análise sem transformação nos dados (Fig. 5, à esquerda, $R^2 = 0,22 \pm 0,03$) suportou que os parâmetros dispersão ($-0,28 \pm 0,04$), tamanho populacional ($-0,24 \pm 0,04$) e mutação ($-0,17 \pm 0,04$) possuem correlação negativa com os valores de Fst, enquanto a taxa de mortalidade possui influência positiva sobre os valores de Fst ($0,23 \pm 0,04$), todos eles significativos ($p < 0,02$ após correção de B-Y). A *Path Analysis* com os dados linearizados

(dados ajustados de acordo com as equações da tabela 1) apresentou um modelo melhor ajustado ($R^2 = 1,00 \pm 0,03$, Fig. 5, à direita). Nessa análise, o parâmetro dispersão demonstrou ser aquele com maior influência sobre os valores de F_{st} ($0,922 \pm 0,002$), seguido por taxa de mortalidade ($0,33 \pm 0,00$), tamanho populacional ($0,16 \pm 0,00$) e taxa de mutação ($0,08 \pm 0,00$), todos significativos ($p < 0,02$).

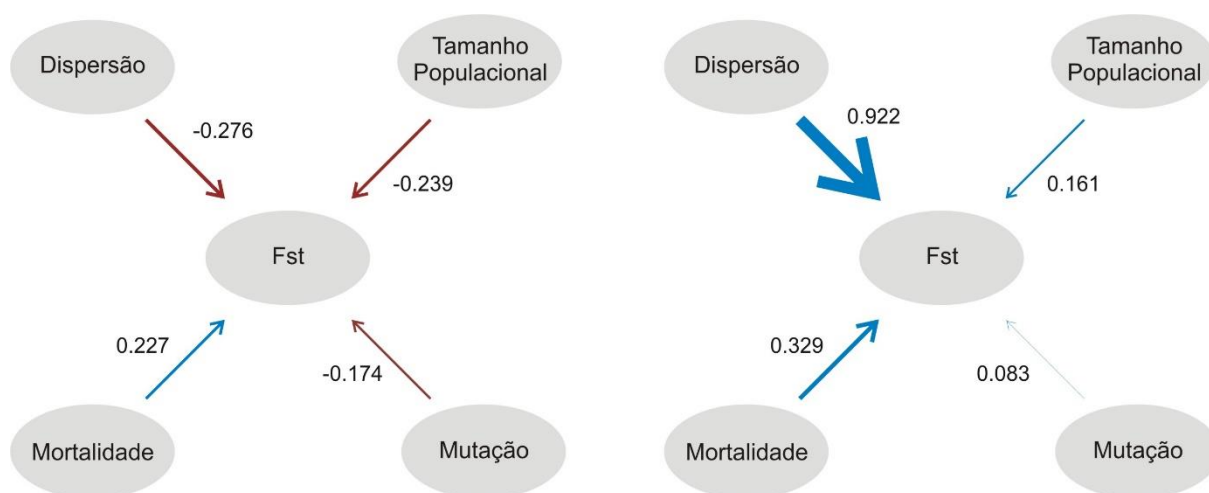


Figura 5. Path analysis com os valores dos parâmetros não linearizados ($R^2 = 0,217$, à esquerda) e linearizados de acordo com as equações da tabela 1 ($R^2 = 0,997$, à direita). Todas as correlações foram significativas.

Impacto de barragens sobre populações que realizam homing

Os valores de F_{st} global foram reduzidos após a adição da barragem para todas as permeabilidades (Fig. 6). O valor de F_{st} global médio antes da adição da barragem (gerações 1501-2000) foi de $0,084 \pm 0,002$, valor diferente (teste t pareado, $p < 0,05$) daqueles da primeira geração após a adição da barragem para ausência de permeabilidades ($F_{st} = 0,029 \pm 0,003$) e para permeabilidades apenas sentido jusante ($F_{st} = 0,028 \pm 0,004$), apenas montante ($F_{st} = 0,029 \pm 0,004$) e em ambos os sentidos ($F_{st} = 0,027 \pm 0,004$).

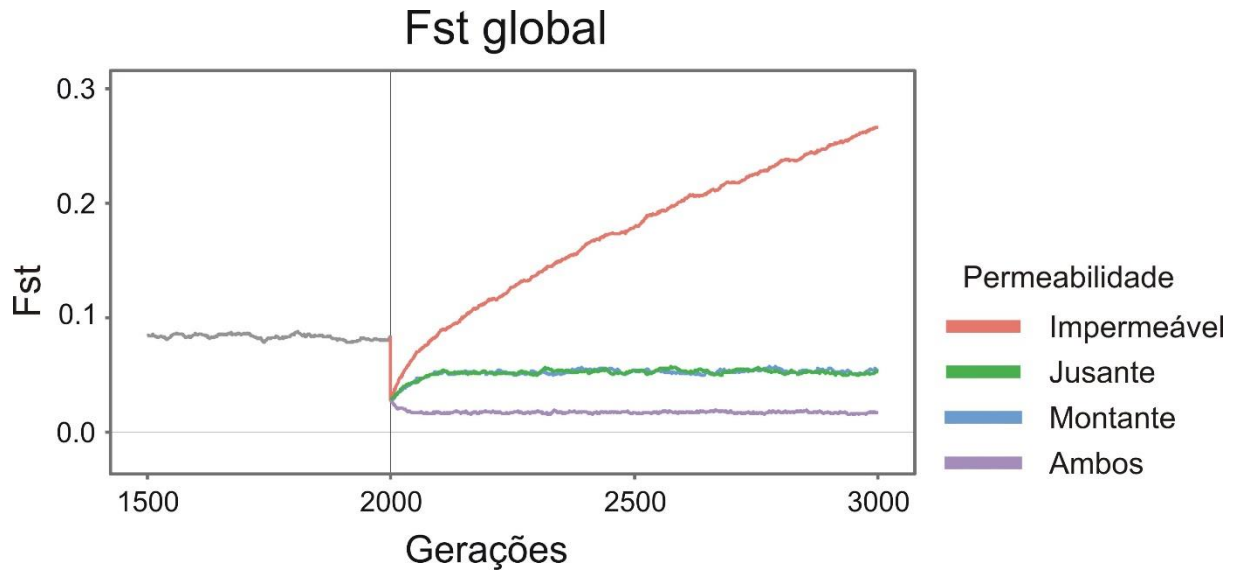


Figura 6. Valores médios (10 corridas) de Fst global após a adição de uma barragem ao sistema (geração 2000), sob diferentes permeabilidades.

No teste de homogeneização genética das populações logo à jusante da barragem, as comparações entre as populações E x F (Tab. 2, Fig. 7) apresentaram grande queda nos valores de diferenciação genética logo após a adição da barragem (anterior à barragem: $F_{st} = 0,083 \pm 0,003$; após a adição da barragem: $F_{st} = 0,014 \pm 0,005$, $F_{st} = 0,010 \pm 0,004$, $F_{st} = 0,013 \pm 0,004$ e $F_{st} = 0,010 \pm 0,004$ para impermeabilidade e permeabilidades para montante, jusante e em ambos os sentidos, respectivamente; teste t pareado, $p < 0,05$). Resultado similar foi encontrado entre as populações adjacentes à montante da barragem (C e D, Tab. 2, Fig. 8). Para a diferenciação genética entre as demais populações (Tab. 2, Fig. 8), as simulações apresentaram valores de Fst menores do que os anteriores logo na primeira geração após a adição da barragem para todas as permeabilidades (teste t pareado, $p < 0,05$), exceto para as comparações entre as populações A x B, A x G, A x H, B x G, B x H e G x H, que não foram diferentes ($p > 0,05$). Os resultados das análises de alocação dos indivíduos em seus respectivos agrupamentos realizados no software Structure suportam a homogeneização genética entre populações adjacentes à barragem a curto prazo, tanto à montante quanto à jusante dela, enquanto as demais populações se mantiveram diferentes geneticamente entre si e das demais populações, para todas as permeabilidades (Fig. 9).

A longo prazo, os valores de Fst global se estabilizaram após 100 gerações em valores de Fst de 0,053 ($\sigma = 0,002$) para as permeabilidades apenas jusante e apenas montante, e de 0,018 ($\sigma = 0,000$) para em ambos sentidos, diferentes daqueles encontrados para o ambiente sem barragem (teste t pareado, $p < 0,05$) (Fig. 6). Nas simulações as quais a barragem é impermeável, os valores de diferenciação genética entre as populações

separadas pela barragem não se estabilizaram em 1000 gerações após a adição de barragem, resultando em valores de F_{st} global acima de 0,25 (média de $F_{st} = 0,188$, $\sigma = 0,005$).

Para as simulações as quais a barragem é impermeável, os valores de diferenciação genética pareadas entre as populações separadas pela barragem não se estabilizaram em 1000 gerações após sua adição (Fig. 8, Tab. 3), resultando em valores de F_{st} acima de 0,35 após esse período. As análises do software Structure suportam a formação desses 2 agrupamentos, um compondo o grupo de populações à montante e outro compondo o grupo de populações à jusante da barragem (Fig. 10). Em contrapartida, os valores de F_{st} pareados dentro de cada trecho retornou para valores próximos, ainda que significativamente menores, daqueles anteriores à adição da barragem ao sistema (teste t pareado, $p < 0.05$; Tab. 3, Fig. 7 e 8). As análises do software Structure com $K = 8$ suportaram a recomposição da estrutura genética anterior a adição da barragem, com 8 agrupamentos geneticamente distintos representando cada uma das populações de cada trecho do rio (Fig. 8).

Para as comparações com permeabilidades assimétricas, houve redução no valor de F_{st} entre as populações de diferentes trechos do rio (populações à montante com aquelas à jusante, teste t pareado, $p < 0,05$). Em contrapartida, os resultados foram diferentes para as comparações dentro de cada trecho para cada permeabilidade. A permeabilidade sentido jusante resultou em diminuição dos valores de diferenciação genética entre as populações à jusante da barragem e aumento entre as populações à montante, resultado inverso à permeabilidade sentido montante (exceto para a comparação B x F que não foram diferentes ao anterior à adição da barragem, teste t pareado, $p > 0.05$). Assim, as análises de agrupamento resultaram em 4 grupos para ambos os cenários, com as populações fonte (à montante quando há permeabilidade sentido jusante; à jusante quando o sentido é inverso) apresentando diferenciação genética entre si, enquanto as populações dreno (aquelas à jusante e à montante, respectivamente) apresentaram perfis genéticos com mistura das populações fonte (Fig. 10).

Para a permeabilidade da barragem em ambas as direções, após a 100ª geração houve a redução do valor de F_{st} para todas as comparações (teste t pareado, $p < 0.05$), exceto entre as populações B x G (teste t pareado, $p > 0.05$). Nessas simulações, as análises de agrupamento não apresentaram distinção no perfil genético entre as populações (Fig. 10).

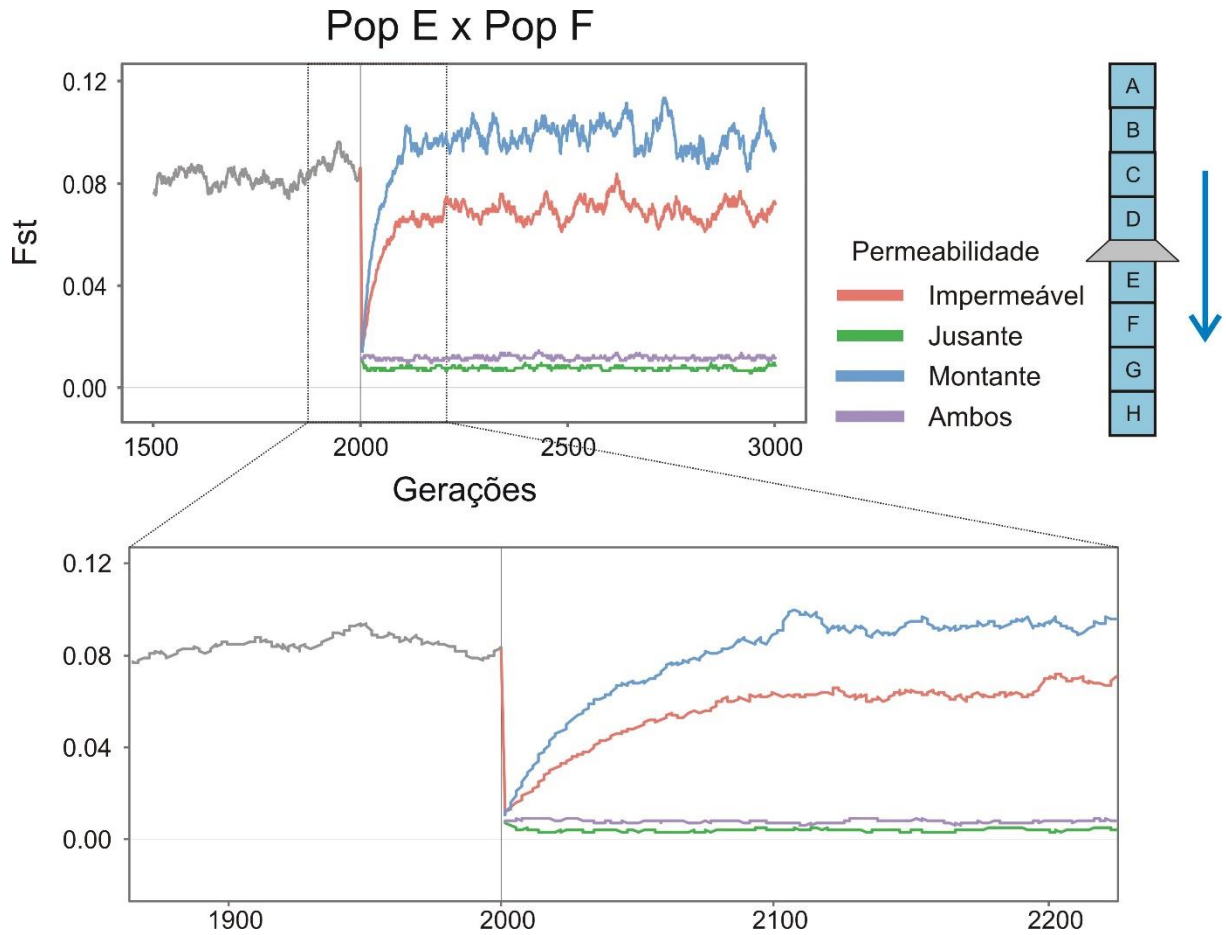


Figura 7. Valores médios (10 corridas) de Fst entre as populações à jusante adjacentes à barragem (e e F), após a adição de uma barragem ao sistema (geração 2000), sob diferentes permeabilidades.

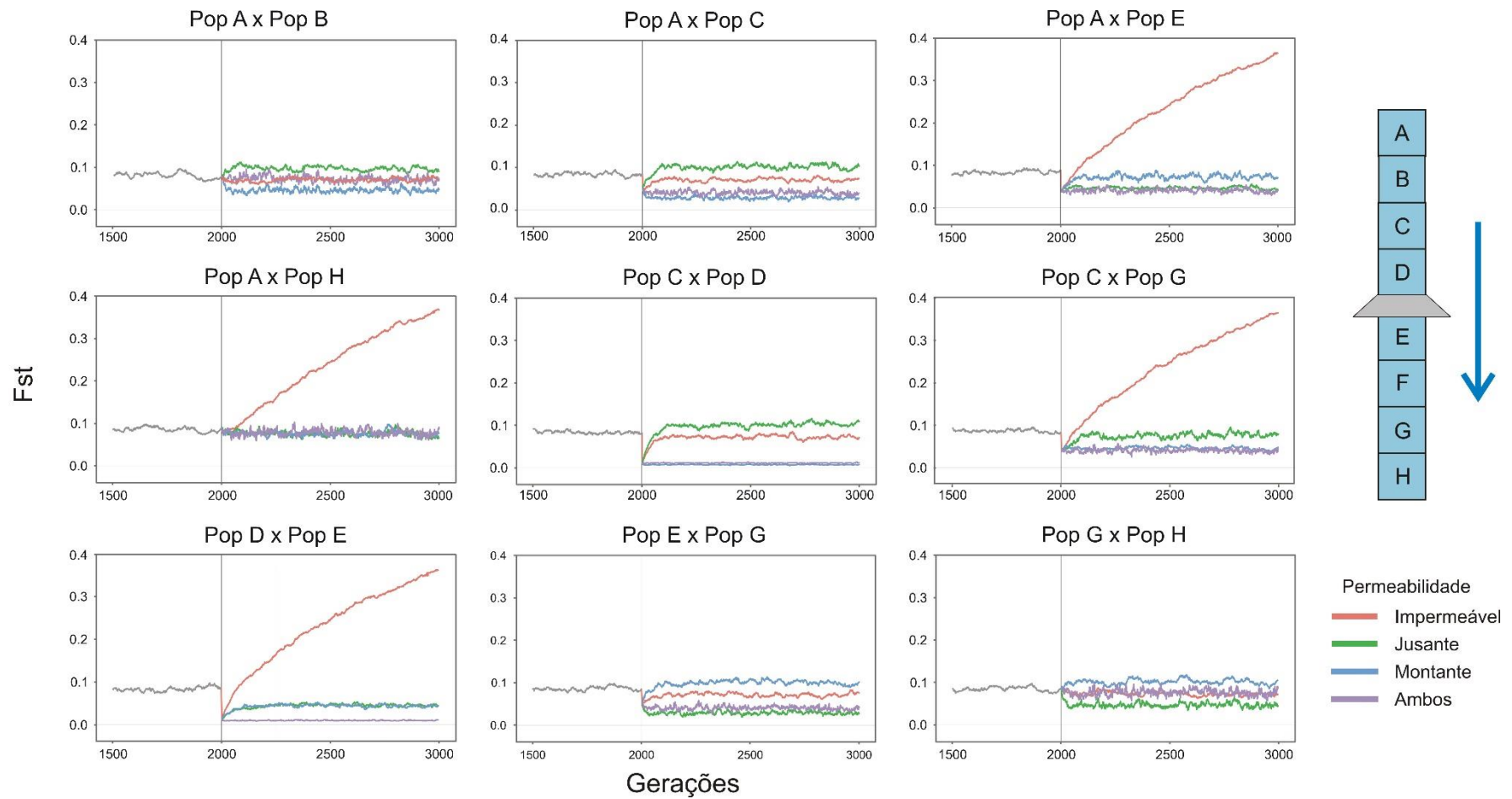


Figura 8. Evolução dos valores médios (10 corridas) de F_{st} entre pares de populações, antes e depois da introdução da barragem (geração 2000), sob diferentes permeabilidades. Os valores de F_{st} entre as populações A e C representam também as comparações B x C, A x D, B x D; entre A x E representam A x F, B x E, B x F; entre A x H representam A x G, B x H, B x G; entre E x G representam E x H, F x G, F x H; entre C x G representam D x G, C x H, D x H; e entre D x E representam C x E, C x F, D x F.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão dos valores pareados de Fst antes da inserção da barragem (gerações 1501-2000) e na primeira geração após a adição da barragem (geração 2001). Os valores de p são resultado de teste t pareado entre os valores de Fst pré e pós inserção da barragem, para cada permeabilidade.

Populações	Pré-barragem		Pós-barragem											
	Fst	σ	Impermeável			Jusante			Montante			Ambas		
			Fst	σ	p	Fst	σ	p	Fst	σ	p	Fst	σ	p
A x B	0.083	0.006	0.075	0.018	ns	0.079	0.016	ns	0.078	0.026	ns	0.074	0.022	ns
A x C	0.083	0.004	0.047	0.015	*	0.052	0.014	*	0.050	0.020	*	0.046	0.018	*
A x D	0.082	0.003	0.047	0.016	*	0.050	0.015	*	0.050	0.021	*	0.046	0.018	*
A x E	0.083	0.007	0.037	0.014	*	0.038	0.013	*	0.040	0.018	*	0.036	0.013	*
A x F	0.082	0.004	0.038	0.011	*	0.038	0.010	*	0.040	0.019	*	0.035	0.014	*
A x G	0.083	0.005	0.078	0.078	ns	0.082	0.019	ns	0.083	0.024	ns	0.077	0.021	ns
A x H	0.085	0.007	0.081	0.016	ns	0.087	0.020	ns	0.089	0.017	ns	0.083	0.018	ns
B x C	0.083	0.007	0.045	0.009	*	0.044	0.011	*	0.042	0.010	*	0.420	0.008	*
B x D	0.083	0.006	0.045	0.011	*	0.045	0.011	*	0.043	0.009	*	0.044	0.007	*
B x E	0.084	0.006	0.039	0.011	*	0.037	0.010	*	0.034	0.009	*	0.033	0.007	*
B x F	0.082	0.005	0.337	0.010	*	0.034	0.010	*	0.035	0.009	*	0.033	0.008	*
B x G	0.083	0.007	0.076	0.015	ns	0.077	0.017	ns	0.076	0.012	ns	0.075	0.014	ns
B x H	0.084	0.007	0.077	0.019	ns	0.076	0.021	ns	0.080	0.014	ns	0.081	0.019	ns
C x D	0.083	0.003	0.010	0.002	*	0.011	0.004	*	0.008	0.004	*	0.009	0.003	*
C x E	0.084	0.005	0.010	0.002	*	0.010	0.002	*	0.009	0.002	*	0.008	0.002	*
C x F	0.085	0.005	0.011	0.003	*	0.010	0.003	*	0.009	0.003	*	0.010	0.002	*
C x G	0.086	0.006	0.039	0.010	*	0.038	0.009	*	0.041	0.010	*	0.036	0.005	*
C x H	0.085	0.008	0.039	0.005	*	0.040	0.008	*	0.042	0.008	*	0.041	0.010	*
D x E	0.082	0.006	0.010	0.002	*	0.010	0.004	*	0.010	0.003	*	0.009	0.002	*
D x F	0.083	0.004	0.012	0.004	*	0.010	0.003	*	0.011	0.002	*	0.010	0.002	*
D x G	0.083	0.005	0.038	0.007	*	0.039	0.010	*	0.039	0.008	*	0.038	0.008	*
D x H	0.084	0.006	0.037	0.008	*	0.039	0.007	*	0.041	0.009	*	0.042	0.008	*
E x F	0.083	0.003	0.014	0.005	*	0.010	0.004	*	0.013	0.004	*	0.010	0.004	*
E x G	0.086	0.006	0.051	0.011	*	0.049	0.014	*	0.052	0.013	*	0.005	0.010	*
E x H	0.084	0.008	0.053	0.011	*	0.052	0.014	*	0.056	0.011	*	0.054	0.013	*
F x G	0.083	0.005	0.050	0.010	*	0.048	0.014	*	0.053	0.013	*	0.047	0.008	*
F x H	0.084	0.006	0.052	0.008	*	0.050	0.011	*	0.055	0.010	*	0.054	0.012	*
G x H	0.084	0.008	0.084	0.013	ns	0.086	0.016	ns	0.088	0.015	ns	0.086	0.013	ns

Tabela 3. Média e desvio padrão dos valores pareados de Fst antes (gerações 1501-2000) e após a inserção da barragem, a longo prazo (gerações 2100-3000). Os valores de p são resultado de teste t pareado entre os valores de Fst pré e pós inserção da barragem, para cada permeabilidade.

Populações	Pré-barragem		Pós-barragem											
	Fst	σ	Impermeável			Jusante			Montante			Ambas		
			Fst	σ	p	Fst	σ	p	Fst	σ	p	Fst	σ	p
A x B	0.083	0.006	0.072	0.005	*	0.099	0.005	*	0.048	0.002	*	0.074	0.004	*
A x C	0.083	0.004	0.071	0.004	*	0.101	0.004	*	0.004	0.001	*	0.040	0.002	*
A x D	0.082	0.003	0.072	0.004	*	0.101	0.006	*	0.028	0.001	*	0.041	0.002	*
A x E	0.083	0.007	0.251	0.010	*	0.046	0.004	*	0.073	0.004	*	0.040	0.002	*
A x F	0.082	0.004	0.252	0.009	*	0.046	0.004	*	0.076	0.003	*	0.040	0.002	*
A x G	0.083	0.005	0.255	0.007	*	0.075	0.006	*	0.074	0.003	*	0.078	0.003	*
A x H	0.085	0.007	0.254	0.008	*	0.076	0.005	*	0.075	0.005	*	0.078	0.003	*
B x C	0.083	0.007	0.072	0.006	*	0.010	0.004	*	0.029	0.001	*	0.040	0.002	*
B x D	0.083	0.006	0.074	0.004	*	0.099	0.005	*	0.029	0.001	*	0.040	0.002	*
B x E	0.084	0.006	0.252	0.008	*	0.045	0.002	*	0.074	0.005	*	0.020	0.002	*
B x F	0.082	0.005	0.253	0.007	*	0.044	0.002	*	0.078	0.003	ns	0.040	0.002	*
B x G	0.083	0.007	0.257	0.005	*	0.075	0.003	*	0.076	0.003	*	0.078	0.004	*
B x H	0.084	0.007	0.255	0.006	*	0.075	0.003	*	0.076	0.005	*	0.079	0.003	ns
C x D	0.083	0.003	0.072	0.002	*	0.101	0.005	*	0.007	0.000	*	0.011	0.000	*
C x E	0.084	0.005	0.251	0.007	*	0.045	0.003	*	0.043	0.003	*	0.008	0.000	*
C x F	0.085	0.005	0.252	0.006	*	0.045	0.002	*	0.046	0.003	*	0.008	0.000	*
C x G	0.086	0.006	0.255	0.005	*	0.076	0.002	*	0.046	0.002	*	0.040	0.001	*
C x H	0.085	0.008	0.025	0.006	*	0.075	0.003	*	0.045	0.003	*	0.041	0.002	*
D x E	0.082	0.006	0.251	0.011	*	0.044	0.003	*	0.044	0.003	*	0.009	0.000	*
D x F	0.083	0.004	0.025	0.009	*	0.044	0.003	*	0.046	0.002	*	0.009	0.000	*
D x G	0.083	0.005	0.255	0.008	*	0.074	0.003	*	0.045	0.002	*	0.040	0.001	*
D x H	0.084	0.006	0.254	0.008	*	0.074	0.003	*	0.045	0.003	*	0.041	0.002	*
E x F	0.083	0.003	0.069	0.003	*	0.007	0.000	*	0.098	0.004	*	0.011	0.000	*
E x G	0.086	0.006	0.072	0.002	*	0.028	0.002	*	0.100	0.002	*	0.040	0.001	*
E x H	0.084	0.008	0.071	0.004	*	0.028	0.000	*	0.097	0.004	*	0.041	0.002	*
F x G	0.083	0.005	0.072	0.003	*	0.028	0.002	*	0.101	0.007	*	0.040	0.001	*
F x H	0.084	0.006	0.071	0.002	*	0.028	0.011	*	0.010	0.008	*	0.041	0.002	*
G x H	0.084	0.008	0.073	0.004	*	0.046	0.002	*	0.101	0.006	*	0.076	0.003	*

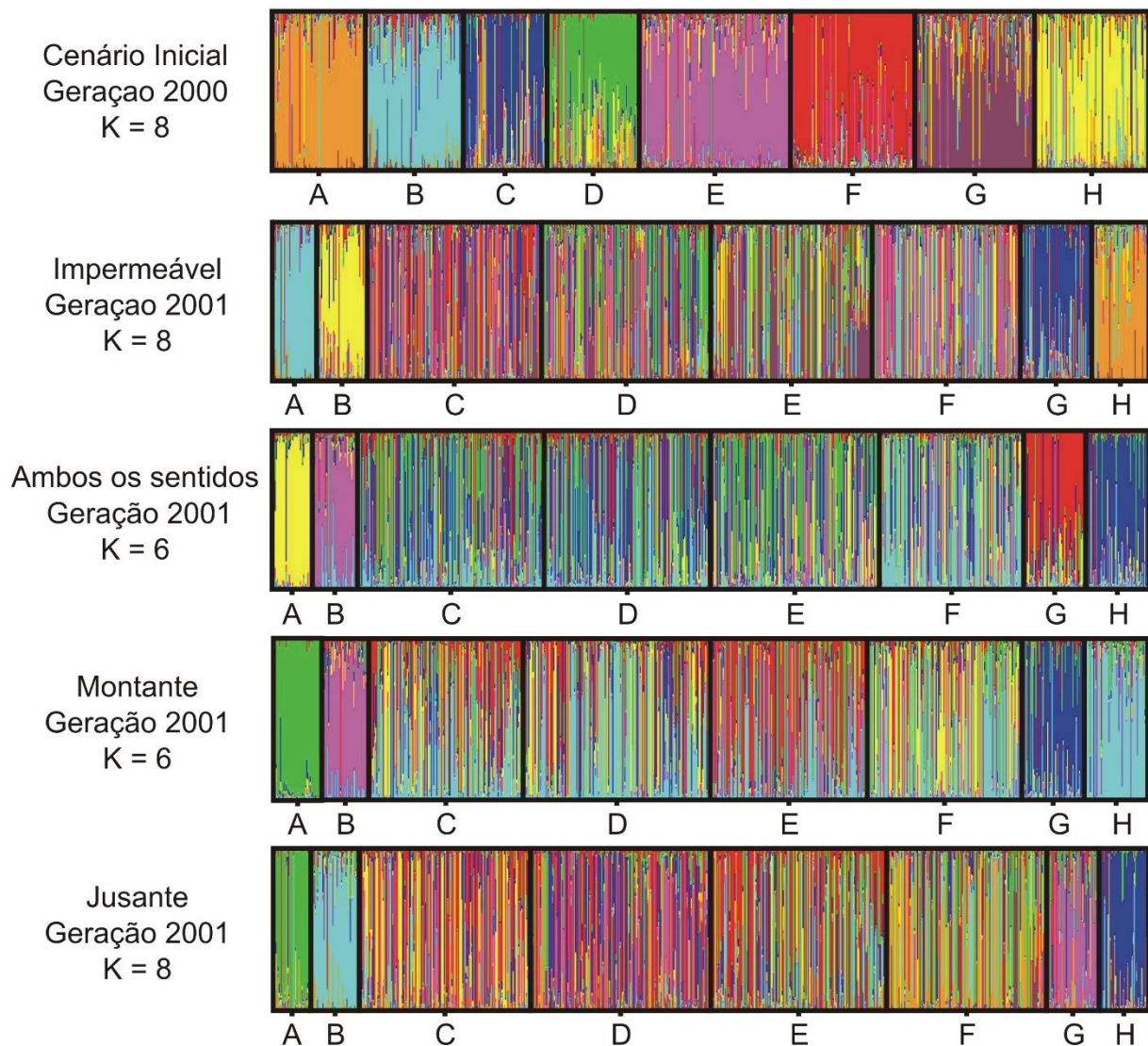


Figura 9. Análise de agrupamento dos indivíduos segundo o perfil genético das populações no cenário inicial (geração 2000, $K = 8$) e para a primeira geração após a adição da barragem (geração 2001), para diferentes cenários: barreira impermeável ($K = 8$), permeáveis em ambos os sentidos ($K = 6$), apenas sentido montante ($K = 6$) e apenas jusante ($K = 8$). Os valores de K são os números de agrupamentos que melhor representam a distinção entre as populações nas análises genéticas realizadas no software Structure.

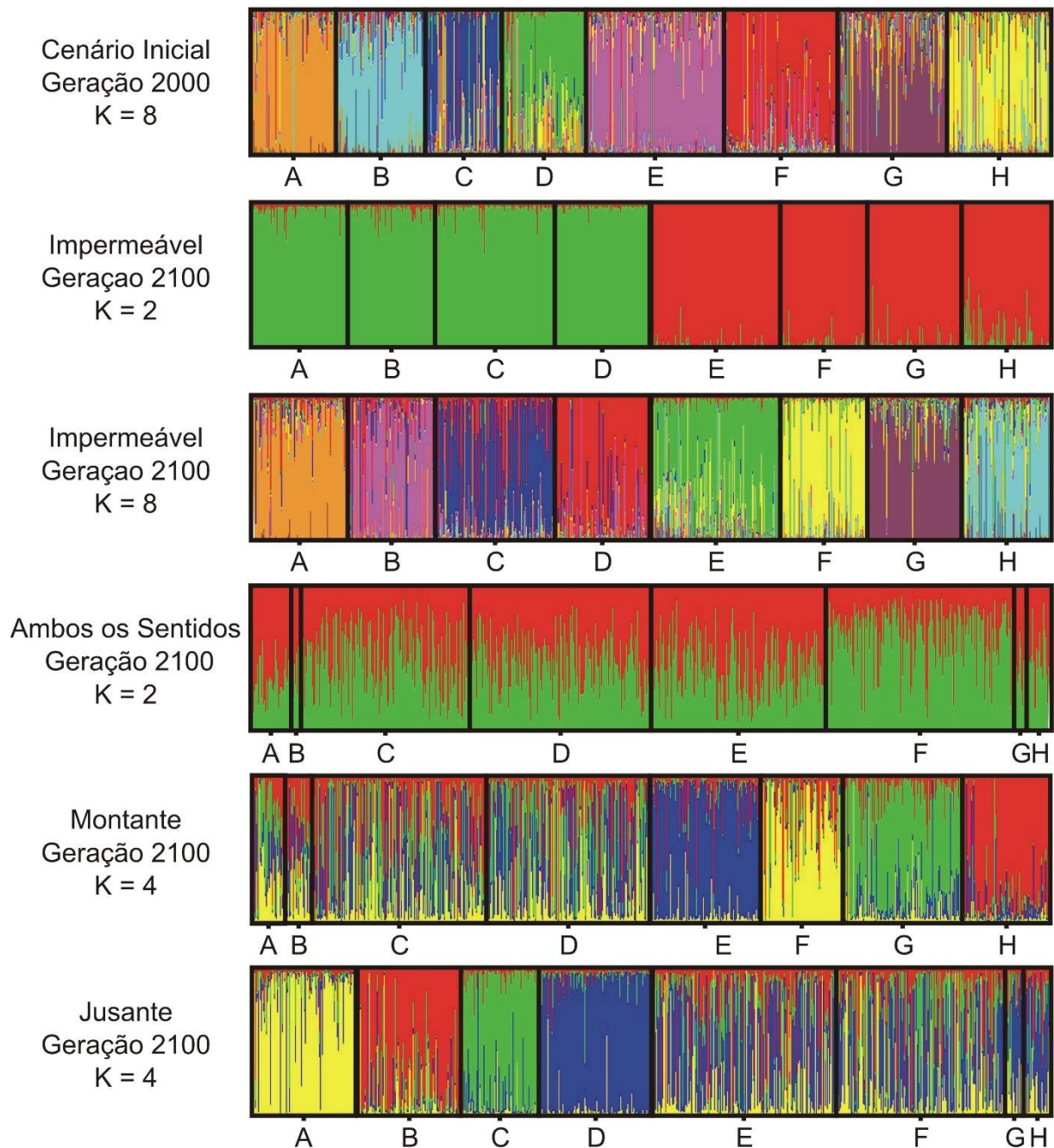


Figura 10. Análise de agrupamento dos indivíduos segundo o perfil genético das populações no cenário inicial (geração 2000, $K = 8$) e a longo prazo (geração 2100), para diferentes cenários: barreira impermeável ($K = 2$ e $K = 8$), permeáveis em ambos os sentidos ($K = 2$), apenas sentido montante ($K = 4$) e apenas jusante ($K = 4$). Os valores de K são os números de agrupamentos que melhor representam a distinção entre as populações nas análises genéticas realizadas no software Structure.

Discussão

Sensibilidade dos parâmetros para determinação da estrutura genética sob condições não impactadas

A estrutura genética gerada pelas simulações do modelo Homing foi semelhante ao padrão dendrítico esperado para espécies de peixes que realizam *homing* (Bouza et al. 1999; Primmer et al. 2006; Wollebæk et al. 2011; Östergren et al. 2012; Baggio et al. Cap. II). Uma vez que em populações que realizam *homing* ocorre fidelidade aos seus sítios de reprodução, os indivíduos de cada área de reprodução se comportam como populações discretas, e a deriva genética e a adaptação local (não avaliado no modelo) geram diferenciação genética entre as populações de cada tributário (*demes*). As populações compõem, portanto, uma metapopulação (Levins 1969), e a intensidade da homogeneidade genética é mantida principalmente pela taxa de dispersão entre as populações. O cenário esperado para espécies que realizam *homing* também considera que há mistura de indivíduos das diferentes populações nos sítios de alimentação. Contudo, o modelo Homing simula apenas os *demes*, uma vez que o local no qual cada indivíduo se alimenta não afeta na escolha de seus locais de reprodução, exceto se uma barreira for adicionada ao sistema durante o período de alimentação, como no caso das simulações com o modelo Barragem.

Dispersão e deriva genética têm sido descritas como os principais fatores que afetam a distribuição da diversidade genética em marcadores neutros (Wright 1951; Nei et al. 1973). Similarmente, as análises realizadas a partir dos resultados das simulações do modelo Homing suportam que a taxa de dispersão é o principal fator que determina a diferenciação genética entre populações. Em seguida, os valores de F_{st} foram influenciados pelos efeitos da deriva genética através do tamanho populacional total e mortalidade, parâmetros que afetam o tamanho efetivo populacional (Wright 1951; Nei et al. 1975; Charlesworth 2009).

As taxas de dispersão e tamanho efetivo populacional demonstraram ser inversamente proporcionais à diferenciação genética, suportando a relação racional entre esses parâmetros já descrita em outros trabalhos (e.g. $F_{st} = \frac{1}{(4*Ne*m+1)}$, Wright 1951). Um corolário dos modelos racionais descritos para esses parâmetros são que os valores de F_{st} são mais afetados pela variação das taxas de dispersão e tamanho populacional quando esses valores são baixos (para o modelo Homing, taxas de dispersão menores do que 5,0% e tamanho populacional total de 2000 indivíduos – média de 400 indivíduos por população). Assim, enquanto na ausência de fluxo gênico as populações tendem a divergir como resultado da deriva genética, baixas taxas de fluxo gênico são capazes de prevenir uma grande diferenciação entre

populações (Wright 1951). Dessa forma, altas taxas de erro no comportamento de *homing* (dispersão entre populações) causam grandes diminuições na diferenciação genética entre as populações, com possibilidade do padrão dendrítico não se estabelecer.

Impacto de barragens sob populações que realizam homing

As simulações do modelo Barragem suportaram a hipótese de Baggio et al. (Cap. II) - populações que realizam *homing* sofrem homogeneização genética quando uma barreira é adicionada ao sistema. A diminuição da diferenciação genética entre as populações, conforme as simulações, é observada tanto a curto (1ª geração após a adição da barragem) quanto a longo prazo (gerações 100 a 1000 após a adição da barragem).

A homogeneização genética a curto prazo foi semelhante para todas as permeabilidades, uma vez que ela é inicialmente determinada pelo isolamento de indivíduos de seus sítios de reprodução e consequente hibridização entre populações. Esses indivíduos, então, tendem a se reproduzir nos tributários adjacentes à barragem (tanto à montante quanto à jusante) pela impossibilidade de migrar para seu tributário de origem (como sugerido por Gerlier e Roche 1998; Sato et al. 2005; Godinho e Kynard, 2006, 2008; Antonio et al. 2007; Brown et al. 2013). Assim, como as populações adjacentes à barragem recebem indivíduos com características genéticas semelhantes, a adição da barragem gera uma redução na diferenciação genética da metapopulação (F_{st} global) a curto prazo (1ª geração). As comparações pareadas das populações suportam o efeito desses indivíduos sobre a diferenciação genética das populações, sendo a homogeneização genética mais intensa entre as populações à montante e à jusante adjacentes à barragem (no caso do modelo: CxD, CxE, CxF, DxE, DxF, ExF), aquelas que recebem os indivíduos isolados.

A longo prazo, o padrão de estrutura genética foi diferente para as diferentes permeabilidades. A ausência de permeabilidade permitiu que as populações reestabelecessem parcialmente os valores de diferenciação genética após aproximadamente 100 gerações, exceto para as comparações de populações separadas pela barragem, que apresentaram valores crescentes de diferenciação genética devido ao seu isolamento pelas barragens. Assim, nesse caso, a única metapopulação original foi dividida em 2 metapopulações menores.

Alternativamente, barragens permeáveis em ambos os sentidos geraram maiores alterações na distribuição da diversidade genética a longo prazo, com a homogeneização genética ocorrendo em todas as populações. Quando a permeabilidade ocorre apenas em um

sentido, as populações que perdem indivíduos através da permeabilidade (montante quando a permeabilidade ocorre sentido jusante, e jusante quando a permeabilidade é sentido montante) reestabelecem a diferenciação genética entre si, ainda que maiores do que os valores anteriores à adição da barragem. O aumento dos valores de diferenciação genética entre essas populações é resultado da perda de indivíduos pela permeabilidade da barragem, o que reduz seu tamanho efetivo populacional e aumenta os efeitos da deriva genética (Charlesworth 2009). Já as populações do trecho que recebe dispersores através da permeabilidade, a diminuição da diferenciação genética entre suas populações é resultado do contínuo recebimento de dispersores do trecho oposto.

Cenário semelhante foi descrito por Wollebæk et al. (2014) para 6 populações de *Salvelinus alpinus* de dois lagos na Noruega (4 populações do Lago Pålbufjord e 2 do Lago Tunhovdfjord), separados entre si por uma barragem. Essas populações apresentaram diferenciação genética entre os locais de reprodução, exceto entre as populações adjacentes à montante e à jusante da barragem. Dessa forma, as populações adjacentes à barragem provavelmente eram diferentes geneticamente, mas a construção dos mecanismos de transposição (túneis) promoveu a homogeneização genética entre elas, resultado semelhante ao encontrado em nossas simulações.

Pseudoplatystoma corruscans da bacia do Alto Rio Paraná

Baggio et al. (Cap. II) desenvolveram um protocolo para testar o comportamento de *homing* em espécies de peixes baseado no padrão dendrítico de estrutura genética para essas espécies, propondo que a diferenciação genética entre as populações das áreas reprodutivas seja testada através da amostragem de larvas coletadas nas partes baixas dos tributários. Esses autores aplicaram essa metodologia para o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, do Alto Rio Paraná, entre a UHE de Porto Primavera (à montante) e o reservatório de Itaipu (à jusante), e encontraram diferenciação genética entre a população de larvas do tributário Rio Amambai e as populações de larvas dos Rios Ivinheima e Ivaí, sem diferenciação genética entre as duas últimas, e mistura das populações na calha principal do Rio Paraná. Com base no padrão de estrutura genético, os autores sugerem que *P. corruscans* realiza *homing*, mas que a ausência de diferenciação genética entre as populações dos Rios Ivinheima e Ivaí resulta do impacto da UHE de Porto Primavera.

As simulações realizadas no presente trabalho suportam a possibilidade de homogeneização genética entre as populações dos Rios Ivinheima e Ivaí devido ao impacto das barragens de Porto Primavera, a qual iniciou seu funcionamento em 1998 (Pelicice e

Agostinho 2008). Para as populações que realizam *homing*, espera-se que a UHE de Porto Primavera impossibilite a migração daqueles indivíduos que se reproduziam à montante e ficaram restritos ao trecho à jusante após seu fechamento, apesar da presença de escadas e elevadores nessa UHE (ver discussão abaixo sobre a ineficiência desses mecanismos). Assim, conforme a hipótese de Baggio et al. (Cap. II), esses indivíduos utilizariam os Rios Ivinheima (margem direita) e Ivaí (margem esquerda), para reprodução. Esses rios são os tributários mais próximos da barragem utilizados para reprodução por espécies migradoras. Dessa forma, espera-se que as espécies de peixes que realizam *homing* na região, como hipotetizado para *P. corruscans*, apresentem homogeneização genética entre as populações desses dois tributários mesmo em poucas gerações (nesse caso, 16 períodos reprodutivos entre o fechamento da barragem e a coleta das amostras). A diferenciação genética detectada nas larvas do Rio Amambá é, também, consistente com os resultados das simulações do presente estudo. Entretanto, o modelo sugere que a estruturação observada no estudo de Baggio et al. (Cap. II) seja menor do que aquela existente antes da construção da UHE de Porto Primavera.

Estudos à jusante da barragem tem suportado que a UHE de Porto Primavera não é permeável no sentido jusante, uma vez que larvas de *P. corruscans* presentes no trecho do Alto Rio Paraná à jusante da barragem antes de seu fechamento não têm sido atualmente encontradas (Sanchez et al. 2006). Dessa forma, segundo as previsões do nosso modelo para barragens impermeáveis, espera-se que a diferenciação genética entre as populações dos Rios Ivinheima e Ivaí seja reestabelecida ao longo das gerações.

Conservação de espécies que realizam homing

A perda de diversidade genética de espécies que realizam *homing* a curto prazo, devido à construção de barragens pode ser bastante prejudicial devido à hibridização entre populações. Os *demes* dessas populações possivelmente possuem características genéticas diferentes entre si, como produto da deriva genética e adaptação local (Hansen et al. 2002, 2007), as quais permitem posicionar cada *deme* diretamente nas áreas com condições ambientais mais adequadas para si (Barthen e Goulding 1997; Hansen et al. 2002, 2007; Hilborn et al. 2003; Wollebæk et al. 2011; Junge et al. 2014). Dessa forma, a hibridização entre populações e consequente perda da estrutura genética pode acarretar na perda de adaptação local e da capacidade de responder a alterações ambientais (Olden et al. 2004), aumentando a probabilidade de extinções locais da espécie. Portanto, medidas de conservação devem ser desenvolvidas durante a construção e fechamento das barragens,

para prevenir ou mitigar os efeitos da homogeneização genética sobre populações que realizam *homing*.

A longo prazo, as simulações indicam que a impermeabilidade da barragem restaura a diferenciação genética entre as populações dentro de cada trecho (montante e jusante) a níveis próximos aos anteriores, o que possibilitaria a restauração de possíveis adaptações locais das populações. Alternativamente, quando a barragem é permeável, a homogeneização é duradora e afeta um maior número de populações, especialmente quando em ambos os sentidos. Menor diferenciação genética entre as populações separadas por barragens é esperada quando há permeabilidade (Marteletto 2015), mas é indesejável quando existem populações discretas antes da sua construção (e.g. Thorstad et al. 2008; Wollebæk et al. 2011). Assim, a possibilidade de restaurar a diferenciação genética entre as populações indica, paradoxalmente, que barragens impermeáveis causam menos impactos a longo prazo em populações que realizam *homing* do que aquelas permeáveis.

Além da distribuição da diversidade genética, aspectos demográficos também devem ser considerados na determinação da melhor estratégia para manutenção da estrutura de espécies que realizam *homing*. Em barragens que permitem dispersão assimétrica, a contínua perda de indivíduos nos trechos superiores (quando a permeabilidade é sentido jusante) ou inferiores (permeabilidade sentido montante) causa redução no tamanho das populações. Tamanhos populacionais pequenos tornam as populações mais susceptíveis a entrar no vórtex de extinção, decorrentes de fatores estocásticos e determinísticos (Efeito Allee, Allee 1938), especialmente quando essas apresentam grande pressão de exploração (Jager 2000, 2006, 2010; Pelicice e Agostinho 2012; Marteletto 2015). Assim, devido aos fatores genéticos e demográficos, barragens com mecanismos de transposição assimétricos de indivíduos devem ser evitadas.

Diversos estudos avaliam as dispersões no sentido jusante através das turbinas e, para montante, através de escadas de barragens em rios neotropicais (ver Pelicice e Agostinho 2008; Agostinho et al. 2008, Pompeu et al. 2012). Na sua maioria, esses estudos têm demonstrado que barragens são “armadilhas ecológicas” para peixes migradores (*ecological traps*, Pelicice e Agostinho 2008), uma vez que escadas são seletivas (apenas algumas espécies a utilizam, Agostinho et al. 2007a; Santos et al. 2013) e são *hotspots* de predação (Agostinho et al. 2012). À montante das represas, muitas vezes, não há locais adequados para alimentação e reprodução (Agostinho et al. 2007c; Pelicice e Agostinho 2008; Britto e Carvalho 2013). Além da baixa eficiência das escadas para movimentos sentido montante, dispersão através de ovos, larvas, juvenis e adultos através das turbinas e escadas,

parecem ser ainda menos frequentes, especialmente naquelas com grandes reservatórios. Esses ambientes são locais de grande predação e sedimentação de ovos e larvas, reduzindo o número daqueles que chegam às escadas e turbinas a valores extremamente baixos, além de adultos evitarem as suas áreas lânticas devido ao seu comportamento reofílico (Agostinho et al. 2007b; Pelicice e Agostinho 2012; Pompeu et al. 2012; Britto e Carvalho 2013; Carvajal-Valhejos et al. 2014). Dessa forma, as escadas construídas em barragens neotropicais têm se demonstrado críticas para a conservação, relacionados à sua baixa eficiência e pela possibilidade de gerar dispersão assimétrica. Especialmente para espécies que realizam *homing*, escadas constituem mecanismos putativos de manutenção da homogeneização genética gerada pelo impacto da barragem e pela possibilidade de redução do tamanho populacional para as populações à jusante.

Concluindo, as simulações suportam que populações que realizam *homing* sofrem homogeneização genética mesmo na primeira geração subsequente à adição da barragem, especialmente para as populações adjacentes a ela. Dessa forma, medidas de manejo devem ser tomadas de forma a diminuir o isolamento dos indivíduos de seus sítios de reprodução durante sua construção para mitigar seus impactos sobre a estrutura genética dessas populações. A longo prazo, barragens impermeáveis possibilitam o reestabelecimento do padrão dendrítico de estrutura genética e manutenção dos tamanhos populacionais das populações que realizam *homing*.

Referências Bibliográficas

Abreu MM, Pereira LHG, Vila VB, Foresti F e Oliveira C (2009) Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. *Gen Mol Biol* 32: 868-873.

Agostinho CS, Agostinho AA, Pelicice FM, Almeida DA, Marques EE (2007a) Selectivity of fish ladders: the first bottleneck in fish movement. *Neotrop Ichthyol* 5: 205-213.

Agostinho CS, Agostinho AA, Pelicice FM, Marques EE (2012) Fish ladders: safe fish passage or hotspot for predation? *Neotrop Ichthyol* 10: 687-696.

Agostinho AA, Marques EE, Agostinho CS, Almeida DA, Oliveira RJ, Rodrigues JBM (2007b) Fish ladder of Lajeado Dam: migration on one way routes? *Neotrop Ichthyol* 5: 121-130.

Agostinho AA, Pelicice FM, Gomes LC (2008) Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Braz J Biol* 68: 1119-1132.

Agostinho CS, Pereira CR, Oliveira RJ, Freitas IS, Marques EE (2007c) Movements through a fish ladder: temporal patterns and motivations to move upstream. *Neotrop Ichthyol* 5: 161-167.

Albrecht M, Pellegrini-Caramaschi E (2003) Feeding ecology of *Leporinus taeniofasciatus* (Characiformes: Anostomidae) before and after installation of a hydroelectric plant in the upper rio Tocantins, Brazil. *Neotrop Ichthyol* 1: 53-60.

Allee WC (1938) *The social life of animals*. Norton, New York.

Alò D, Turner TF. 2005. Effects of Habitat Fragmentation on Effective Population Size in the Endangered Rio Grande Silvery Minnow. *Conservation Biology* 4, 1138–1148.

Antonio RR, Agostinho AA, Pelicice FM, Bailly D, Dias JHP (2007) Blockage of migration routes by dam construction: can migratory fish find alternative routes? *Neotrop Ichthyol* 5: 177-184.

Barroca TM, Santos GB, Duarte NVR, Kalapothakis E (2012) Evaluation of genetic diversity and population structure in a commercially important freshwater fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae) using complex hypervariable repeats. *GMR* 11: 4456-4467.

Barthem RB e Goulding M (1997) *Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá/CNPq. Tefé.

Batista JS (2010) Caracterização genética da dourada – *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores

moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios conservação e manejo. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Batista JS, Alves-Gomes J (2006) Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *GMR* 5: 723-740.

Baumgartner G, Nakatani K, Gomes LC, Bialetzki A., Sanches PV, Makrakis MC (2004) Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River, Brazil. *Environ Biol Fish* 71: 115–125.

Bouza C, Arias J, Castro J, Sánchez L, Martínez P (1999) Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta* L. at the Southern limit of the distribution range of the anadromous form. *Mol Ecol* 8: 1991–2001.

Britto SGC, Carvalho ED (2013) Reproductive migration of fish and movement in a series of reservoirs in the Upper Parana River basin, Brazil. *Fish Manag Ecol* 20: 426-433.

Brown JJ, Limburg KE, Waldman JR, Stephenson K, Glenn EP, Juanes F (2013) Fish and hydropower on the U.S. Atlantic coast: failed fisheries policies from half-way technologies. *Conserv Lett* 6: 280–286.

Carvajal-Vallejos FM, Duponchelle F, Desmarais E, Cerqueira F, Querouil S, Nuñez J, Renno JF (2014) Genetic structure in the Amazonian catfish *Brachyplatystoma rousseauxii*: influence of life history strategies. *Genet* 142: 323-336.

Carvalho-Costa, LF, Hatanaka, T, Galetti, PM (2008) Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genet Mol Biol* 31: 377-380.

Charlesworth B (2009) Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nat Rev Genet* 10: 195-205.

Clarke AD, Telmer KH, Shrimpton JM (2007) Habitat use and movement patterns for a fluvial species, the Arctic grayling, in a watershed impacted by a large reservoir: evidence from otolith microchemistry. *J Appl Ecol* 44: 1156–1165.

Earl, DA., vonHoldt, BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4: 359-361.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620.

- Fagan WF, Aumann C, Kennedy CM, Unmack PJ (2005) Rarity, fragmentation, and the scale dependence of extinction risk in desert fishes. *Ecol* 86: 34–41.
- Fagan WF, Unmack PJ, Burgess C, Minckley WL (2002) Rarity, fragmentation, and extinction risk in desert fishes. *Ecol* 83: 3250–3256.
- Gerking SD (1959) The restricted movement of fish populations. *Biol Rev* 34: 221–242.
- Gerlier M, Roche P (1998) A radio telemetry study of the migration of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the sea trout (*Salmo trutta trutta* L.) in the upper Rhine. *Hydrobiologia* 371/372: 283-293.
- Godinho AL, Kynard B (2006) Migration and Spawning of Radio-Tagged Zulega *Prochilodus argenteus* in a Dammed Brazilian River. *T Am Fish Soc* 135: 811–824.
- Godinho AL, Kynard B (2008) Migratory fishes of Brazil: Life history and fish passage needs. *River Res App* 25: 702-712.
- Godinho AL, Kynard B., Godinho HP (2007) Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environ Biol Fish* 80: 421–433.
- Godoy MP (1959) Age, growth, sexual maturity, behavior, migration, tagging, and transplantation of the curimatá (*Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881) of the Mogi Guaçu River, São Paulo State, Brasil. *An Acad Bras Cienc* 31: 447–477.
- Godoy MP (1975) Peixes do Brasil (Fishes of Brazil). Franciscana, Piracicaba, Brazil.
- Gosset C, Rives J, Labonne J (2006) Effect of habitat fragmentation on spawning migration of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecol Freshw Fish* 15: 247-254.
- Hansen MM, Ruzzante DE, Nielsen EE, Bekkevold D, Mensberg KLD (2002) Long-term effective population sizes, temporal stability of genetic composition and potential for local adaptation in anadromous brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Mol Ecol* 11: 2523-2535.
- Hansen MM, Skaala Ø, Jensen LF, Bekkevold D, Mensberg KL (2007) Gene flow, effective population size and selection at major histocompatibility complex genes: brown trout in the Hardanger Fjord, Norway. *Mol Ecol* 16: 1413–1425.
- Hatanaka T, Henrique-Silva F, Galletti Jr. M (2006) Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genet* 126: 153–159.

- Heggenes J, Røed KH (2006) Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. *Ecol Freshw Fish* 15: 366–375.
- Hilborn R, Quinn RP, Schindler DE, Rogers DE (2003) Biocomplexity and fisheries sustainability. *P Nat Aca Sci USA* 100: 6564–6568.
- Holsinger KE, Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *EEB Art. Paper* 22.
- Horreo JL, Martinez JL, Ayllon F, Pola IG, Monteoliva JA, Héland M, Garcia-Vazquez E (2011) Impact of habitat fragmentation on the genetics of populations in dendritic landscapes. *Freshw Biol* 56: 2567-2579.
- Jager HI (2006) Chutes and ladders and other games we play with rivers. I. Simulated effects of upstream passage on white sturgeon. *Can J Fish Aquat Sci* 63: 165–175.
- Jager HI, Bevelhimer MS, Lepla KB, Chandler JA, Winkle WV (2007) Evaluation of reconnection options for white Sturgeon in the Snake River using a Population Viability Model. *Am Fish Soc Sy* 56: 319-335.
- Jager HI, Chandler JA, Lepla KB, Van Winkle W (2001a) A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. *Environ Biol Fish* 60: 347–361.
- Jager HI, Lepla KB, Van Winkle W, James BW, McAdam SO (2010) The elusive minimum viable population size for white Sturgeon. *T Am Fish Soc* 139: 1551-1565.
- Jager HI, Van Winkle W, Chandler JA, Lepla KB, Bates P, Counihan TD (2001b) A Simulation Study of Factors Controlling White Sturgeon recruitment in the Snake River. *Am Fish Soc Sy*.
- Junge C, Museth J, Hindar K, Kraabøl M, Asbjørn Vøllestad L (2014) Assessing the consequences of habitat fragmentation for two migratory salmonid fishes. *Aquat Conserv: Mar Freshw Ecosys* 24: 297-311.
- Levins R (1969) Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *B Entomol Soc Am* 15: 237-240.
- Loureiro-Crippa VE, Hahn NS (2006) Use of food resources by the fish fauna of a small reservoir (rio Jordão, Brazil) before and shortly after its filling. *Neotrop Ichthyol* 4: 357-362.
- Marteleteo FM (2015) Os efeitos da introdução de barreiras artificiais em rios sobre a genética populacional em peixes. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná.

- Meirmans PG (2015) Seven common mistakes in population genetics and how to avoid them. *Mol Ecol* 24: 3223-3221.
- Mérona B, Santos GM, Almeida RG (2001) Short term effects of Tucuruí Dam (Amazonia, Brazil) on the trophic organization of fish communities. *Environ Biol Fish* 60: 375–392.
- Mérona B, Vigouroux R, Horeau V (2003) Changes in food resources and their utilization by fish assemblages in a large tropical reservoir in South America (Petit-Saut Dam, French Guiana). *Acta Oecol* 24: 147–156.
- Morita K, Yokota A (2002) Population viability of stream-resident salmonids after habitat fragmentation: a case study with white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) by an individual based model. *Ecol Model* 155: 85–94.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *PNAS* 70: 3321.
- Neraas LP, Spruell P (2001) Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Mol Ecol* 10: 1153–1164.
- Olden JD, Poff NL, Douglas MR, Douglas ME, Fausch KD (2004) Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *TREE* 19: 18-24.
- Östergren J, Nilsson J, Lundqvist H (2012) Linking assignment testes with telemetry enhances understanding of spawning migration and homing in sea trout *Salmo trutta* L. *Hydrobiologia* 691: 123-134.
- Paiva SR, Dergam JA, Machado F (2006) Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bifasciatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Hydrobiologia* 560: 393–404.
- Pamponet VCC, Carneiro PLS, Affonso PRAM, Miranda VS, Silva Junior JC, Oliveira GC, Gaiotto FA (2008) A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax* aff. *bifasciatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. *Neotrop Ichthyol* 6: 621-630.
- Pelicice FM, Agostinho AA (2008) Fish passage facilities as ecological traps in large Neotropical Rivers. *Conserv Biol* 22: 180-188.
- Pelicice FM, Agostinho CS (2012) Deficient downstream passage through fish ladders: case of the Peixe Angical Dam, Tocantins, Brazil. *Neotrop Ichthyol* 10: 705-713.

Pereira LHG, Foresti F e Oliveira C (2009) Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. *Ecol Freshw Fish* 18: 215–225.

Pompeu PS, Agostinho AA, Pelicice FM (2012) Existing and future challenges: the concept of successful fish passage in South America. *River Res App* 28: 504-512.

Primmer CR, Veselov AJ, Zubchenko A, Poututkin A, Bakhmet I, Koskinen MT (2006) Isolation by distance with a river system: genetic population structuring of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, in tributaries of the Varzuga River in northwest Russia. *Mol Ecol* 15: 653-666.

Pritchard JK, Stephens M e Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genet* 155: 945-959.

Rueda EC, Carriquiriborde P, Monzón AM, Somoza GM, Ortí G (2013) Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus luntatus*) in the Lower Uruguay River. *Genet* 141: 401-407.

Sanches A, Galetti Jr. PM, Galzerani F, Derazo J, Cutilak-Bianchi B, Hatanaka T (2012) Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Latin Am J Aquat Res* 40: 177-186.

Sanches PV, Nakatanu K, Bialetzki A, Baumgartner G, Gomes LC, Luiz EA (2006) Flow regulation by dams affecting ichthyoplankton: the case of the Porto Primavera Dam, Paraná River, Brazil. *River Res App* 22: 555-565.

Santos ABI, Albieri RJ, Araujo FG (2013) Influences of dams with different levels of river connectivity on the fish community structure along a tropical river in Southeastern Brazil. *J App Ichthyol* 29: 163-171.

Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E, Boschi MB, Miranda MOT (2005) Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, southeastern Brazil. *River Res App* 21: 939-950.

Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genet* 139: 457-462.

Thorstad EB, Okland F, Aarestrup K, Heggberget TG (2008) Factors affecting the within-river spawning migration of Atlantic salmon, with emphasis on human impacts. *Rev Fish Bio Fish* 18: 345-371.

Weir BS (1996) Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Associates, Sunderland.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evol* 38: 1358-1370.

Wollebæk J, Heggenes J, Røed KH (2011) Population connectivity: dam migration mitigations and contemporary site fidelity in arctic char. *BMC Evolut Biol* 11: 207.

Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genet* 16: 97-159.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *An Eugenic* 15: 323-354.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Padrões de diversificação e distribuição da diversidade genética apresentados pelas espécies são resultados da interação entre características biológicas, que compreendem a capacidade para se diversificar, e características ambientais, que propiciam a oportunidade de diversificação (Araujo *et al.* 2015). Essas características interagem ao longo do tempo, de forma que o mosaico de padrões presentes na natureza é resultado tanto de eventos presentes quanto de eventos passados (Rickefts 2004, Brooks e Agosta 2012). Nessa tese, marcadores moleculares foram utilizados para avaliar a interação desses fatores na determinação do padrão de diversificação e estrutura genética de espécies de peixes neotropicais.

No primeiro modelo (**Capítulo I**), a estrutura genética do peixe-rei *Atherinella brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1825) foi avaliada através dos fragmentos mitocondriais D-loop e Citocromo Oxidase B. Os resultados suportam que a incapacidade de manutenção do fluxo gênico da espécie (dispersão entre estuários) durante períodos de alta do nível do mar possibilitou diversificação alopátrica dessas populações (oportunidade). Contudo, os padrões de estrutura genética diferentes entre as populações do nordeste e no sul do Brasil suportam que diferenças no tamanho da plataforma continental afetam a oportunidade de dispersão entre populações e o padrão de diversificação da espécie ao longo do tempo. Enquanto a plataforma continental no nordeste é rasa e estreita, de forma que durante a regressão do mar os estuários provavelmente se mantiveram isolados, no sul ela é profunda e extensa, possibilitando conexão entre bacias e estuários e trocas genéticas durante eventos de baixa do nível do mar. Assim, os ciclos de isolamento (alta do nível do mar) e expansão (regressão do nível do mar) propiciam às populações do sul diversificarem por *Taxon Pulse* (Erwin 1979, 1981, 1985, Brooks e McLennan 2001), enquanto as populações do nordeste mantêm contínua oportunidade de diferenciação alopátrica e, como resultado disso, apresentaram grande diferenciação genética e endemismo de linhagens.

Em escala temporal mais recente, no **Capítulo II**, foi testado a presença do comportamento de *homing* (capacidade) do pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829) no Alto Rio Paraná (entre as UHE de Itaipu e Porto Primavera), através do padrão de estrutura genética de suas populações.

O padrão dendrítico das bacias hidrográficas e sua heterogeneidade ambiental (corredeiras, ambientes lênticos e lóticos) propiciam a distinção entre as áreas de reprodução, desenvolvimento e alimentação, e a utilização daquelas regiões com maiores probabilidades

de sucesso na reprodução de cada população (*homing* - capacidade). Propusemos, nesse capítulo, a utilização de larvas para amostrar a diversidade genética das populações dos sítios de reprodução, uma metodologia que demonstrou ser promissora no teste de hipótese de *homing* em espécies de peixes, capaz de detectar diferenciação genéticas entre populações de larvas mesmo em escalas espaciais pequenas. As diferenças entre as populações de larvas (identificação das larvas realizada no **Capítulo III**) do Rio Amambá com aquelas dos Rios Ivinheima e Ivaí e mistura das populações na área de alimentação (regiões baixas dos tributários e calha principal do Rio Paraná) sugerem que a espécie realiza *homing* na região. Contudo, os resultados suportam que as populações dos Rios Ivinheima e Ivaí não são diferentes geneticamente, o que pode ser decorrente de outros eventos contemporâneos, como o impacto de barragens.

Para testar essa hipótese, no **Capítulo IV** um modelo matemático foi criado. Suas simulações geraram cenários de diferenciação genética esperados para populações de peixes que realizam *homing* e, então, os impactos da inserção de uma barragem ao sistema sobre a estrutura genética foram avaliados. Os resultados demonstram que a adição de uma barragem gera redução da diversidade genética entre as populações, especialmente nas populações adjacentes à barragem e naquelas permeáveis. Assim, os resultados dos **Capítulos II e IV** sugerem que *P. corruscans* da bacia do Alto Rio Paraná realiza comportamento de *homing*, mas que a presença da UHE de Porto Primavera provavelmente causou homogeneização genética entre as populações dos Rios Ivaí e Ivinheima. Dessa forma, as condições geradas pela barragem (isolamento inicial, impermeabilidade e permeabilidade) propiciam diferentes oportunidades para a espécie ao longo do tempo relacionadas a sua capacidade de realizar *homing*: homogeneização genética ou nova oportunidade de diferenciação entre as populações.

Os resultados dos capítulos dessa tese, portanto, apresentam diferentes modelos que exemplificam os padrões de estrutura genética resultado da interação entre suas capacidades com as oportunidades propiciadas pelo ambiente. Essas capacidades e as oportunidades se modulam interativamente e influenciam o padrão de diversidade genética em diferentes escalas espaciais e temporais. A putativa ausência de dispersão entre populações de *A. brasiliensis* possibilita que ocorram ciclos de isolamento e diversificação alopátrica. Populações com alta capacidade de dispersão entre diferentes estuários não apresentariam padrão semelhante de diversificação (e.g. caranguejo *Ucides cordatus* em Oliveira-Neto *et al.* 2007, 2008, 2014, robalo *Centropomus parallelus* em Prodócimo *et al.* 2007).

Populações de peixes dulcícolas não-migradores (capacidade) não possuem a oportunidade de explorar a heterogeneidade ambiental através de áreas de alimentação, desenvolvimento e reprodução distintas. A ausência dessa capacidade (migração) e oportunidade (utilização de diferentes áreas) impossibilita o desenvolvimento do comportamento de *homing* na espécie. *Homing*, por sua vez, é responsável pela heterogeneidade de *pools* reprodutivos observados nas espécies com esse comportamento. Portanto, os fatores biológicos e ambientais interagem ao longo da história evolutiva de seus táxons, e propiciam o desenvolvimento de novas capacidades e oportunidades, influenciando a estrutura genética de espécies de peixes neotropicais através de um cenário complexo em diferentes escalas espaciais e temporais.

A abordagem que compõe esses fatores é essencial para o entendimento dos mecanismos que geram a biodiversidade atual, além de possibilitar a previsão da evolução dos grupos de seres vivos e de embasar o desenvolvimento de estratégias de manutenção dos potenciais evolutivos de espécies de peixes neotropicais.

Referências Bibliográficas

Araujo SBL, Braga MP, Brooks DR, Agosta SJ, Hoberg EP, Von Hartenthal FW, Boeger WA. 2015. Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. *PLoS One* **10**, e01339225.

Brooks DR, Agosta SJ. 2012. Children of time: The extended synthesis and major metaphors of evolution. *Zoologia* **29**, 497-514.

Brooks DR, McLennan DA. 2001. A comparison of a discovery-based and an event-based method of historical biogeography. *Journal of Biogeography* **28**, 757–767.

Erwin TL. 1979. Thoughts on the evolutionary history of ground beetles: hypotheses generated from comparative faunal analyses of lowland forest sites in temperate and tropical regions. In: Erwin TL, Ball GE, Whitehead DR. *Carabid beetles – their evolution, natural history, and classification*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 539–592.

Erwin TL. 1981. Taxon pulses, vicariance, and dispersal: an evolutionary synthesis illustrated by carabid beetles. In Nelson G, Rosen DE. *Vicariance biogeography – a critique*, Columbia University Press, New York, 159–196.

Erwin TL. 1985. The taxon pulse: a general pattern of lineage radiation and extinction among carabid beetles. In Ball GE. *Taxonomy, Phylogeny and Biogeography of Beetles and Ants*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 437–472.

Oliveira-Neto JF, Baggio RA, Ostrensky A, Chammas MA, Boeger WA. 2014. Assessing the genetic diversity and gene flow of the populations of the crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) on the Brazilian coast using microsatellite markers. *Journal of Crustacean Biology* **34**, 70-75.

Oliveira-Neto JF, Pie MR, Boeger WA, Ostrensky A, Baggio RA. 2007. Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). *Marine Ecology* **28**, 1-10.

Oliveira-Neto JF, Chammas MA, Ostrensky A, Boeger WA. 2008. Phylogeography of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) along the Brazilian coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **88**, 1417-1423.

Prodocimo V, Tschá MK, Pie MR, Oliveira-Neto JF, Ostrensky A, Boeger WA. Lack of genetic differentiation in the fat snook *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) along the Brazilian coast. *Journal of Fish Biology* **73**, 2075-2082.

Ricklefs RE. 2004. A comprehensive framework for global patterns in biodiversity. *Ecology Letters* **7**, 1-15.