



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINE APOLINÁRIO DA SILVA

**ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE  
*HYPOSTOMUS ANCISTROIDES* (SILURIFORMES:  
LORICARIIDAE) EM RIBEIRÕES DA BACIA DO ALTO RIO  
PARANÁ**

---

Londrina  
2017



**Universidade Estadual de Londrina**



**Instituto Agronômico do Paraná**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

---

CAROLINE APOLINÁRIO DA SILVA

**ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hypostomus*  
*ancistroides* (SILURIFORMES: LORICARIIDAE) EM  
RIBEIRÕES DA BACIA DO ALTO RIO PARANÁ**

---

Londrina - PR  
2017

CAROLINE APOLINÁRIO DA SILVA

**ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE  
*HYPOSTOMUS ANCISTROIDES* (SILURIFORMES:  
LORICARIIDAE) EM RIBEIRÕES DA BACIA DO ALTO RIO  
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Silvia Helena Sofia

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva, Caroline Apolinário da.

Estrutura e diversidade genética de *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae) em ribeirões da bacia do alto rio Paraná. / Caroline Apolinário da Silva. – Londrina, 2017.  
61 f. : il.

Orientador: Sílvia Helena Sofia.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Peixes Neotropicais - Tese. 2. Cascudo - Tese. 3. Ribeirões - Tese. 4. Marcadores moleculares - Tese. I. Sofia, Sílvia Helena . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CAROLINE APOLINÁRIO DA SILVA

**ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *HYPOSTOMUS*  
*ANCISTROIDES* (SILURIFORMES: LORICARIIDAE) EM RIBEIRÕES  
DA BACIA DO ALTO RIO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dra. Silvia Helena Sofia  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Alberto José Prioli  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof. Dr. Paulo Ruas  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 20 de fevereiro de 2017.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos que permaneceram ao meu lado nessa jornada, sempre me apoiando, ensinando e proporcionando momentos felizes e inesquecíveis.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, por todo apoio logístico, infraestrutura e incentivos indispensáveis para realização deste trabalho. Em especial ao Departamento de Transporte por ter disponibilizado veículos para as coletas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, por contribuírem com a minha formação e possibilitarem a realização deste trabalho, em especial a Lícia por toda ajuda durante esse período.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Fundação Araucária, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

O IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) /ICMBio (Instituto Chico Mendes-MMA), pela licença de coleta de amostras.

À UENP-Campus de Cornélio Procopio, por ter me proporcionado a formação acadêmica e por todo apoio logístico e de infraestrutura que me ajudaram a realizar grande parte do meu trabalho.

Aos Professores da Pós-Graduação, por todo o conhecimento repassado a nós, em especial as professoras Ana Lúcia por toda ajuda no período em que estive à frente da secretaria da Pós e a professora Fernanda, minha segunda chefe, que sempre se mostrou disposta a ajudar.

À querida orientadora Silvia Helena Sofia, que fez muito além do que me orientar, sempre cuidou para que este trabalho fosse realizado da melhor maneira, não medindo esforços para conseguir tudo o que fosse necessário. Também me ensinou muito, tanto como ótima profissional que é, mas também como excelente professora. Serei eternamente grata por ter me aceito com sua orientada.

Aos professores Alberto José Prioli, Paulo Ruas, Fernando Jerep, Eduardo Augusto Ruas, Fernanda Simões de Almeida e Rogério Fernandes de Souza, que aceitaram prontamente em participar da avaliação deste trabalho, contribuindo para que ele se torne o melhor possível.

Ao meu co-orientador e grande amigo Dhiego Gomes Ferreira, que confiou em mim para a realização desse projeto, me dando todo o suporte e toda amizade também. Tenho muita admiração pela pessoa e pelo grande profissional que você se tornou, espero um dia ser assim também.

Ao meu professor e grande amigo Bruno Ambrozio Galindo, o grande responsável pela minha iniciação no mundo da genética, sempre transmitindo grande entusiasmo durante as aulas e em laboratório, é também um grande exemplo de vida para mim, como profissional e como pessoa, são pessoas como você de que o mundo precisa.

À toda equipe do LAGEA e companhia, que estiveram comigo durante esses dois anos sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos Robson e Raul que foram essenciais para que esse trabalho fosse concluído, sempre me ajudando nas coletas realizadas pela UEL, sempre com muito esforço, dedicação e muita alegria.

À toda equipe do GECON do qual serei sempre integrante também, foi meu lar durante a graduação e ainda é e mesmo estando mais longe sempre recebi todo apoio e ajuda dessa equipe, em especial a Jéssica Meschini que muito me ajudou na época da graduação e se tornou uma grande amiga e a Thais Diniz que foi minha ajudante durante a parte prática deste trabalho.

À todos os meus queridos amigos, que em algum momento dessa jornada passaram pela minha vida e ofereceram tantas coisas boas, uma pena não poder levar todos vocês comigo, mas estarão sempre no meu coração e nas lembranças maravilhosas que guardo, em especial a Carolina Honda que está ao meu lado desde a graduação sendo a melhor amiga que eu preciso ter.

À minha queridíssima amiga Camila, pela amizade, ajuda e todos ensinamentos da vida, serei eternamente grata por ter você em minha vida, cuidando de mim até nos momentos em que você era a pessoa que precisava de cuidados, grande exemplo de vida para mim, espero um dia ser mais como você.

Ao meu grande amigo Wilson, pela amizade e disposição em ajudar, fosse para ensinar a rodar programas, construir mapas ou conselhos de apresentação, mas também por todas as conversas e momentos de descontração.

Ao meu namorado Luís Eduardo Gazal, que é meu ponto de apoio e melhor amigo, sou imensamente grata por toda ajuda, companheirismo, preocupação, pelas longas conversas, conselhos, risadas e principalmente pela paciência. Amo muito você.

À minha família, por todo apoio que sempre me deram, é muito importante para mim ter vocês próximos a mim, sempre me amando e confiando em minhas escolhas. Amo muito vocês.

À Deus, por todas essas maravilhosas pessoas que Ele colocou no meu caminho e sei que por meio delas ele age em minha vida, dando todo apoio e amor que preciso.

SILVA, Caroline Apolinário da. **Estrutura e diversidade genética de *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae) em ribeirões da bacia do alto rio Paraná.** 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

Drenagens de pequeno porte, tais como ribeirões, abrigam grande parte das espécies de peixes de água doce da região Neotropical, fornecendo condições particulares quando comparadas com drenagens de maior porte. Ao mesmo tempo, características intrínsecas também fazem com que ribeirões sejam ambientalmente muito sensíveis. Deste modo, a condução de estudos nestes ambientes tem sido algo essencial dentro do atual cenário de degradação de ecossistemas de água doce. Enquanto vários estudos têm buscado compreender a composição ictiofaunística destas drenagens, ainda são poucos os estudos voltados à investigação da diversidade genética e estrutura das populações de espécies de peixes presentes em ribeirões Neotropicais, a despeito da extrema importância do conhecimento genético para a compreensão de aspectos evolutivos e para propostas de conservação. Assim, o presente estudo investigou, com base em marcadores microssatélites e haplótipos mitocondriais (*D-Loop*), os níveis de variação genética e padrões de diferenciação populacional do peixe *Hypostomus ancistroides*, popularmente conhecido como cascudo, de seis ribeirões pertencentes à bacia do rio Laranjinha, no norte do Paraná. Em cada ribeirão foram obtidas amostras em três seções (alto, médio e baixo) ao longo do ribeirão. Dados genéticos de um outro estudo, que amostrou três pontos (alto, médio e baixo) da calha principal do rio Laranjinha também foram incluídas nas análises. No total, 602 amostras de *H. ancistroides* foram analisadas. Os resultados revelaram uma estruturação genética significativa das amostras, tanto dentro, quanto entre os ribeirões. Dos 23 haplótipos obtidos 11 foram encontrados somente em ribeirões, estando ausentes nas amostras coletadas no rio Laranjinha; de modo similar, 36 alelos microssatélites foram exclusivos para as amostras dos ribeirões. Os níveis de diversidade genética foram similares a outros trabalhos para a mesma espécie (*D-loop*: 0,652, microssatélites: 0,644). De modo geral, os dados mostraram que a diversidade genética de *H. ancistroides* é heterogeneamente distribuída ao longo da bacia do rio Laranjinha, existindo parcelas particulares da diversidade em cada um de seus pequenos afluentes e também indicam um padrão de estruturação genética em pequena escala para os ribeirões estudados. Assim, além de contribuir para um melhor entendimento das influências da biologia de *H. ancistroides* sobre seus aspectos evolutivos e distribuição na bacia, os resultados do presente estudo também apontam para o fato de que a preservação de ribeirões é essencial para a preservação de toda a diversidade genética de uma espécie amplamente distribuída.

**Palavras chave:** Peixes neotropicais. Cascudo. Ribeirões. *D-loop*. Microssatélites.

SILVA, Caroline Apolinário da. **Structure and genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae) in streams of basin of the Upper Paraná River.** 2017. 61 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

### ABSTRACT

Small drainages such as streams harbor a large part of the Neotropical freshwater fish species, providing particular conditions when compared to larger drainages. At the same time, intrinsic features also make streams very environmentally sensitive. Thus, studies on these environments has been essential in the current degradation scenario of freshwater ecosystems. Several studies have sought to understand the ichthyofaunistic composition of these drainages. However, few studies have aimed to understand the genetic structure and diversity of fish species from Neotropical streams, even this knowledge providing essential information to understanding of evolutionary aspects and conservation proposals. Thus, this study employed microsatellites and mitochondrial haplotypes (D-loop) analysis in populations of *Hypostomus ancistroides*, an armored catfish species widespread in Paraná River basin drainages, seeking information about genetic diversity levels and population differentiation patterns. Samples were obtained from six streams in Laranjinha River basin. Each stream was sampled in three different sections (upper, middle and lower). Genetic data from another study, which sampled three locations in the Laranjinha River (upper, middle and lower) were also included in the study. A total of 602 specimens was analysed. Results showed a significant genetic structure within and among streams. Among the 23 haplotypes obtained, eleven were found only in streams, being absent in the samples from main channel of the Laranjinha River. Similarly, 36 microsatellite alleles were exclusively found in streams samples. Genetic diversity levels were similar to those obtained in previous studies of *H. ancistroides* (D-loop:  $h = 0.652$ , microsatellites:  $H_E = 0.644$ ). In general, the results showed that: *i* - the genetic diversity of *H. ancistroides* is heterogeneously distributed along the Laranjinha River basin; *ii* - some particular portions of genetic diversity exist in each stream; *iii* - fine-scale genetic structure patterns occur along the streams. Thus, besides to contribute to a better understanding of biological influences of *H. ancistroides* on evolutionary aspects and distribution patterns in the basin, the results of the present study also highlight that streams preservation is essential for the conservation of all genetic diversity of a widely distributed species.

**Keywords:** Neotropical ichthyofauna. Suckermouth catfish. Streams. D-loop. Microsatellite

## LISTA DE FIGURAS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1:** Exemplar de *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) coletado no rio Laranjinha. Número de registro 10548 – CP: 11,0 cm (FOTO: Galindo, 2014).....8

### CAPÍTULO 1

#### Métodos

- Fig. 1:** Mapa mostrando os pontos de amostragem *Hypostomus ancistroides* na calha principal e nos ribeirões afluentes do rio Laranjinha (Fonte: modificado de Google Earth, 2016). Em azul, trechos do alto, médio e baixo rio Laranjinha, em vermelho, trechos do alto, médio e baixo dos ribeirões.....28

#### Resultados

- Fig. 2:** Rede de haplótipos obtida a partir do sequenciamento da região *D-loop* (DNAmT) em 602 amostras de *Hypostomus ancistroides* proveniente de 21 localidades. Os tamanhos dos círculos são proporcionais às frequências dos haplótipos.....36
- Fig. 3:** Representação da distribuição *mismatch* para os haplótipos mitocondriais obtidos para *Hypostomus ancistroides* em duas localidades amostradas. Os gráficos das outras localidades podem ser visualizados nos materiais suplementares.....39
- Fig. 4:** Representação gráfica obtidas de  $K = 2$  gerado a partir de 9 locos microsatélites para as amostras de *Hypostomus ancistroides* coletados em 18 localidades da bacia do rio Laranjinha, alto rio Paraná, no sul do Brasil.....42

#### Material Suplementar

- Figura 1:** Distribuição *mismatch* para os haplótipos mitocondriais obtidos para *Hypostomus ancistroides* ao longo das 21 localidades amostradas, considerando cada ponto individualmente.....59

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

#### Métodos

<b>Tabela 1:</b> Extensão do rio Laranjinha e dos seis ribeirões selecionados para o estudo, pertencentes à bacia hidrográfica do alto rio Paraná, Brasil. São apresentadas as coordenadas geográficas de cada trecho amostrado, a distância entre os trechos amostrados dentro de cada drenagem. Cód. = abreviação do nome dos ribeirões seguido pela seção amostrada, <sup>A</sup> = Alto, <sup>M</sup> = Médio e <sup>B</sup> = Baixo; N = número de <i>H. ancistroides</i> coletado em cada ponto.....	28
--	----

#### Resultados

<b>Tabela 2:</b> Diversidade genética de <i>Hypostomus ancistroides</i> ao longo dos 21 pontos amostrados, obtida a partir de marcadores microsatélites e DNAm. <i>N</i> – Número de indivíduos analisados, <i>A</i> – número total de alelos, <i>N<sub>P</sub></i> – número de alelos privados, <i>R<sub>A</sub></i> – riqueza alélica, <i>N<sub>A</sub></i> – número médio de alelos, <i>N<sub>E</sub></i> – número de alelos efetivos, <i>H<sub>O</sub></i> – heterozigosidade observada, <i>H<sub>E</sub></i> – heterozigosidade esperada, <i>F<sub>IS</sub></i> – índice de endogamia, <i>EHW<sup>Hanc</sup></i> – quantidade e identificação de locos com desvios no equilíbrio de Hardy–Weinberg para cada amostra. <i>Nh</i> – número de haplótipos encontrados, <i>h</i> – diversidade haplotípica, $\pi$ – diversidade nucleotídica, <i>D</i> – teste de neutralidade de Tajima (Tajima, 1989), <i>F<sub>s</sub></i> – teste de neutralidade de Fu (Fu, 1997) *Valores significativos $P \leq 0,05$ .....	35
---	----

<b>Tabela 3:</b> Distribuição dos 23 haplótipos e seus sítios variáveis encontrados entre 602 amostras de <i>Hypostomus ancistroides</i> provenientes vinte e uma localidades da bacia do rio Laranjinha, o qual pertence à bacia do alto rio Paraná, Brasil. A última coluna informa quantos haplótipos estão presentes em cada localidade amostrada.....	37
--	----

<b>Tabela 4:</b> Testes de gargalos genéticos recentes ( <i>Bottleneck</i> ) para <i>Hypostomus ancistroides</i> nos 18 pontos amostrados. Teste de <i>Wilcoxon sign-rank</i> para excesso de heterozigosidade e teste <i>Mode-shift</i> para padrões de distribuição das frequências alélicas. <i>N</i> – Número de indivíduos analisados, <i>H<sub>d</sub></i> – número de locos exibindo deficiência de heterozigosidade, <i>H<sub>e</sub></i> – número de loci exibindo excesso de heterozigosidade.....	38
<b>Tabela 5:</b> Análise da Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de <i>Hypostomus ancistroides</i> coletados em 21 localidades de um rio e ribeirões pertencentes à bacia do alto rio Paraná, no sul do Brasil. Valores significativos * <i>P</i> ≤0,05.....	40
<b>Tabela 6:</b> Diferenciação genética par a par ( $\Phi_{ST}$ ) estimadas a partir de marcadores microssatélites e haplótipos mitocondriais, de amostras de <i>Hypostomus ancistroides</i> , referentes aos pontos de amostragens, distribuídos em um rio e seis ribeirões da bacia do alto rio Paraná, no sul do Brasil. Diagonal inferior - $\Phi_{ST}$ par a par obtido a partir de dados de microssatélites. Diagonal superior - $\Phi_{ST}$ par a par obtido a partir de dados de DNAm ( <i>D-Loop</i> ). Valores significativos * <i>P</i> ≤0,05 (teste de significância usando 1023 permutações).....	41
<b>Material Suplementar</b>	
<b>Tabela 1:</b> Estimativas de fluxo gênico obtida por inferência Bayesiana das taxas de migração utilizando o programa BayesAss. Valores de migrantes e de não migrantes dentro de cada uma das 18 amostras estudadas. Os valores em negrito representam a proporção de não migrantes em cada amostra. Entre parênteses intervalo de confiança (IC).....	58

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	2
2.	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	4
2.1.	<b>Ribeirões neotropicais</b> .....	4
2.2.	<b>Bacia do rio das Cinzas e rio Laranjinha</b> .....	6
2.3.	<b><i>Hypostomus ancistroides</i> (Ihering, 1911)</b> .....	7
2.4.	<b>Genética da Conservação e Marcadores Moleculares</b> .....	9
2.4.1.	Marcadores microssatélites.....	10
2.4.2.	Região <i>D-loop</i> do DNA mitocondrial .....	11
3.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	13
4.	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
4.1.	<b>Objetivos Gerais</b> .....	21
4.2.	<b>Objetivos Específicos</b> .....	21
5.	<b>TRABALHO</b> .....	22
5.1.	<b>Capítulo 1</b> .....	22

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente os ecossistemas de água doce estão entre os ambientes naturais mais ameaçados do mundo (STRAYER; DUDGEON, 2010). Em diferentes regiões do planeta, tanto peixes como outros organismos de água doce têm apresentado constantes perdas de biodiversidade, principalmente em consequência de diferentes formas de interferência antrópica, incluindo práticas agrícolas mal conduzidas, super-exploração, poluição ambiental, degradação de habitats, alterações no fluxo dos rios, fragmentação de habitats e introdução de espécies exóticas (CARPENTER et al., 2011; BARLETTA et al., 2010). Dentre os ecossistemas de água doce, os ribeirões são um dos ambientes mais sensíveis a essas interferências, principalmente devido ao seu pequeno porte e reduzido volume de água (LUIZ et al., 1998). Interessantemente, apesar de seu tamanho reduzido, quando comparado aos rios, ribeirões abrigam um considerável número de espécies de peixes de pequeno porte, os quais representam quase 50% de toda a diversidade estimada para as drenagens brasileiras (GRAÇA; PAVANELLI, 2007).

Considerando a importância destas drenagens, vários estudos têm sido conduzidos em ribeirões neotropicais, visando obter informações sobre a composição ictiofaunística (CASTRO et al., 2003; CUNICO et al., 2009; COSTA et al., 2013), interferências de fatores bióticos e abióticos (VIEIRA; SHIBATTA, 2007; VIEIRA et al., 2014), ou mesmo sobre a influência de ações antrópicas (ARIAS et al., 2007; FERREIRA; CASATTI, 2006). Contudo, quando se considera informações sobre os padrões de distribuição genética de peixes em ribeirões neotropicais, pouquíssimos estudos foram realizados (SOFIA et al., 2008; FERREIRA et al., 2016) e acabam não elucidando questões sobre os possíveis padrões dentro destas drenagens. Em sistemas de drenagem não neotropicais, diferentes estudos têm sugerido a ocorrência de padrões de diferenciação genética em curtas distâncias geográficas ao longo de ribeirões (CARLSSON et al., 1999; CARLSSON; NILSSON, 2000; KELSON et al., 2015). Além disto, parcelas particulares de diversidade parecem ser mantidas entre os diferentes ribeirões de uma bacia hidrográfica (ADAMSON et al., 2012). Apesar da importância destas informações para o entendimento da distribuição genética das espécies de peixes, permitindo a compreensão de aspectos evolutivos e elaboração de ações de manejo, nenhum estudo buscou de fato avaliar a ocorrência de tais padrões em sistemas de drenagens neotropicais. Segundo Geist (2011), a incorporação de informações genéticas em estudos populacionais, pode melhorar muito a compreensão de processos ecológicos tais como, adaptação e vias de colonização e pode também aumentar a eficiência das abordagens de

conservação da biodiversidade. O autor ainda afirma que as ferramentas genéticas são úteis para a designação de prioridades de conservação (por exemplo, para a identificação de populações prioritárias ou áreas de *hotspot* para conservação) e para manter o potencial genético evolutivo das espécies.

De fato, o uso de marcadores microsatélites e a análise de regiões mitocondriais em estudos populacionais de espécies de peixes vem trazendo importantes informações sobre as espécies, o que auxilia na elaboração de medidas eficientes de manejo e proteção, visando principalmente à preservação dos ambientes aquáticos (CALCAGNOTTO; DESALLE, 2009; MATSUMOTO; HILSDORF, 2009; PEREIRA et al., 2009). Porém, devido a escassez de análises genéticas em ribeirões, há a necessidade de estudos focados nesses ambientes para conseguir esclarecer a dinâmica presente nessas drenagens, que reconhecidamente diferem das drenagens de maior porte (CASTRO et al., 1999).

Rios e ribeirões da bacia do rio Paraná, tem sofrido constantemente com os impactos antrópicos, tais como os barramentos (AGOSTINHO et al., 2005, 2007, 2008). Contudo, algumas drenagens ao longo desta bacia apresentam boas condições para um amplo estudo genético de peixes em ribeirões (MATOSO et al., 2010) e apesar de o grande número de barramentos que fragmentam seus principais tributários (AGOSTINHO et al., 2007, 2008) ser um fator limitante, ainda existem bacias, tais como a do rio Laranjinha, integrante da bacia do rio das Cinzas (alto rio Paraná), que possui poucas influências de barramentos (apenas uma) e um grande número de ribeirões em ambas as margens da calha principal (MAACK, 2002).

O cascudo *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911), é uma espécie de peixe amplamente distribuída no rio Laranjinha (GALINDO, 2014) e apresenta baixo deslocamento reprodutivo (AGOSTINHO et al., 2007), o que torna essa espécie interessante para estudos de distribuição genética, pois, espécies com hábitos não migradores tendem a exibir algum grau de divergência genética entre suas subpopulações (ENDO et al., 2012).

Sendo assim, o presente estudo buscou, por meio de ferramentas moleculares, obter informações sobre os padrões de distribuição genética existente para uma espécie não migradora que apresenta padrão de dispersão limitada, as quais poderiam ser consideradas em futuros planejamentos de conservação. Além disso, este estudo possivelmente fornece condições para a comparação e a interpretação dos diferentes aspectos que podem estar influenciando sobre a distribuição e organização da diversidade genética de uma espécie, tais como as diferenças nos gradientes de condições químicas, físicas (tipo de substrato, largura, presença de barreiras naturais ou artificiais, entre outros fatores) e biológicas ao longo do fluxo, além das diferentes formas de interferências antrópicas que podem estar atuando em diferentes trechos destas drenagens.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Ribeirões neotropicais

A região Neotropical é responsável por uma das maiores concentrações de biodiversidade do planeta (ALBERT; REIS, 2011). Dentre os ambientes mais diversos desta região, destacam-se os ecossistemas continentais de água doce, que abrigam uma grande concentração de vertebrados e invertebrados aquáticos (BALIAN et al., 2008). Grande parte destas espécies é representada por peixes, constituindo a ictiofauna de água doce dos neotrópicos, a mais diversa do mundo, com uma estimativa de 8000 - 9000 espécies existentes (LÉVÊQUE et al., 2008; REIS et al., 2016).

A maior parte desta diversidade de peixes se encontra em território brasileiro (cerca de 2.500 espécies), onde as águas continentais formam a rede hidrográfica mais extensa do mundo (GRAÇA; PAVANELLI, 2007). Aproximadamente metade desta fauna é composta por peixes de pequeno porte que habitam, principalmente, pequenos corpos d'água como ribeirões (CASTRO et al., 1999). Apesar disso, a maior parte do conhecimento genético de populações de peixes da região Neotropical está limitada a estudos em grandes rios e com espécies de grande porte (HATANAKA et al., 2006; LOPES et al., 2007; CARVALHO-COSTA; HATANAKA; GALETTI JR, 2008; ABREU et al., 2009; CALCAGNOTTO; DESALLE, 2009; MATSUMOTO; HILSDORF, 2009; PEREIRA et al., 2009), sendo poucos os estudos dentro de pequenos tributários (SOFIA et al., 2006; SOFIA et al., 2008; PHILIPPSEN et al., 2009).

De modo particular, ribeirões são drenagens de grande importância para a ictiofauna da região Neotropical, exibindo muitas características particulares, tais como variação nos padrões longitudinais de zoneamento, diferenças entre faunas inter-regionais e variações ambientais em escalas diárias, sazonais e interanuais (WINEMILLER et al., 2008) e essa grande diversificação que determinam condições diferenciadas em relação a drenagens de maior porte, fornecendo habitats únicos e suporte a funções ecológicas fundamentais, tais como reprodução e alimentação (CASTRO, 1999; ESTEVES; ARANHA, 1999; CASTRO et al., 2003; RICE et al., 2008).

De fato, as dimensões reduzidas constituem um dos principais determinantes das características intrínsecas de ribeirões (CASTRO, 1999; WINEMILLER et al., 2008). Do mesmo modo, os menores volumes de água e a ictiofauna de pequeno porte também resultam em uma maior sensibilidade ambiental para estas drenagens (LUIZ et al., 1998). Destacando

que o elevado grau de endemismo de boa parte das espécies dessa ictiofauna acaba por formar áreas geograficamente restritas, onde, dado o devido tempo, podem ser originadas taxas relativamente elevadas de especiação (CASTRO et al. 1999).

Assim, embora ainda pouco considerados em ações de preservação, ribeirões parecem constituir áreas prioritárias, principalmente dentro do atual cenário dos ecossistemas de água doce da região Neotropical, onde ribeirões e outras drenagens têm sido constantemente impactados por atividades antropogênicas (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2005). Considerando tais fatores, estudos têm buscado entender a ictiofauna desta região e as possíveis inferências exógenas (CASTRO et al., 2003; VIEIRA; SHIBATTA, 2007; COSTA et al., 2013; VIEIRA et al., 2014). Contudo, quando se leva em consideração a distribuição genética de peixes ao longo destas drenagens, o conhecimento disponível ainda é muito limitado (SOFIA et al., 2006, 2008; FERREIRA et al., 2015).

Ao contrário do cenário da região Neotropical, estas informações têm sido buscadas com frequência em ribeirões do Hemisfério Norte e revelam importantes padrões de estrutura genética em fina escala (CARLSSON et al., 1999; CARLSSON; NILSSON, 2000), diferenças entre ribeirões de uma mesma bacia (KELSON et al., 2015), diferenciações resultantes de estruturas geomorfológicas (CARLSSON; NILSSON, 2001) e influências de ações antrópicas (FLUKER et al., 2014). Contudo, a extrapolação destes resultados para drenagens da região Neotropical é inapropriada, uma vez que ribeirões temperados e tropicais diferem em muitos aspectos, principalmente com relação à composição de espécies, histórias evolutivas, padrões de precipitação, temperatura da água e tipo de vegetação ripária (COVICH, 1988; BOULTON et al., 2008).

Os poucos estudos realizados até o momento, envolvendo populações de peixes de ribeirões da região Neotropical, sugerem que espécies com pouca diferenciação genética ao longo de rios maiores apresentam estrutura genética em pequena escala dentro de ribeirões (LEUZZI et al., 2004; SOFIA et al., 2006; SOFIA et al., 2008). Do mesmo modo, ribeirões também parecem abrigar uma constituição genética típica em relação a outros corpos d'água da mesma bacia (FERREIRA et al., 2015). Particularmente, a confirmação de tais padrões constitui uma enorme contribuição para o entendimento da dinâmica de ribeirões e conservação da biodiversidade em drenagens de água doce neotropicais. Deste modo, estudos genéticos populacionais de espécies amplamente distribuídas ao longo de uma bacia hidrográfica, ou seja, ocorrendo de modo dendrítico, no rio (calha principal) e nos ribeirões (afluentes), poderia auxiliar na elucidação de diversos aspectos importantes.

## 2.2. Bacia do rio das Cinzas e rio Laranjinha

A região do Alto rio Paraná distribui-se por aproximadamente 900.000 km<sup>2</sup>, percorrendo os estados de São Paulo, na região oeste da Serra do Mar, a porção sul dos estados de Minas Gerais e Goiás, a região norte do estado do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul e pequena área do Paraguai oriental adjacente ao Mato do Sul (CASTRO et al., 2003). Fazendo parte desta bacia se encontra o rio Paraná, décimo maior rio do planeta (GRAÇA; PAVANELLI, 2007) e segundo maior da América do Sul é formado pela junção dos rios Grande e Paranaíba, apresentando uma extensão de 4.695 km (AGOSTINHO; PELICICE; GOMES, 2008). O sistema do Alto rio Paraná é uma das bacias hidrográficas da região Neotropical que possui uma das ictiofaunas de ribeirões mais bem conhecidas atualmente (CASTRO et al., 2003; CASATTI, 2004; SHIBATTA; CHEIDA, 2003; SHIBATTA; SILVA-SOUZA, 2008; CUNICO et al., 2009; COSTA et al., 2013).

O rio Paranapanema, um importante afluente da margem esquerda do rio Paraná, nasce na Serra de Paranapiacaba (SP) e possui uma extensão aproximada de 930 km, dos quais cerca de 330 km, a partir da foz do rio Itararé, forma a divisa entre os estados de São Paulo e Paraná. Devido a sua localização e seu desnível (aproximadamente 600 metros), é amplamente utilizado para a geração de energia hidroelétrica, encontrando-se fragmentado por mais de dez barramentos, o que transformou o mesmo em um complexo sistema de cascatas artificiais (NOGUEIRA, 1996). Uma das principais drenagens da bacia do rio Paranapanema é a bacia do rio das Cinzas. Esta drena uma área total de 9.658,8 km<sup>2</sup>, com 240 km de extensão, é o principal curso d'água da região norte do estado do Paraná conhecida, por questões históricas, como "Norte Pioneiro". O rio das Cinzas nasce na Serra de Furnas, no município de Piraí do Sul, e desagua no rio Paranapanema, na divisa dos municípios de Santa Mariana e Itambaracá, no norte do estado do Paraná. Seus principais afluentes são: o ribeirão Grande, o ribeirão Jaboticabal, o ribeirão Vermelho e o rio Laranjinha, constituindo este último rio, o principal afluente da margem esquerda do rio das Cinzas (MAACK, 2002).

Tal drenagem é essencial para a manutenção da ictiofauna do médio Paranapanema, haja vista que o rio das Cinzas é utilizado como local de desova de muitas espécies de peixes que habitam o Reservatório de Capivara (médio Paranapanema). Infelizmente, análises limnológicas, realizadas no rio das Cinzas, mostraram um gradiente de degradação ao longo do rio, que pode agir negativamente no recrutamento efetivo das populações de peixes e devido à similaridade limnológica entre o rio das Cinzas e o baixo rio Laranjinha, é possível que este venha sofrendo impactos da mesma natureza (VIANNA; NOGUEIRA, 2008).

O rio Laranjinha, principal afluente da margem esquerda do rio das Cinzas, nasce no município paranaense de Ventania e possui sua foz na divisa das cidades de Bandeirantes e Santa Mariana no mesmo estado, localizando-se na Bacia Sedimentar do Paraná, com nascente e foz, respectivamente, no Segundo e Terceiro Planaltos Paranaenses (MAACK, 2002). Com 350 km de extensão considerando suas sinuosidades, o rio Laranjinha recebe noventa afluentes, de modo que a maior parte é representada por drenagens de pequeno porte (MAACK, 2002).

Em um recente e inédito levantamento da ictiofauna do rio Laranjinha, Galindo (2014) amostrou 103 espécies, dentre as quais: dez são migradoras, seis constam na lista de espécies ameaçadas do estado do Paraná e três são, possivelmente, espécies ainda não descritas, evidenciando assim a importância de se preservar o rio Laranjinha como um patrimônio da diversidade de peixes.

Muitas das drenagens da bacia do alto rio Paraná apresentam condições para um amplo estudo genético de ribeirões, porém o grande número de barramentos ao longo dos principais tributários torna-se um fator limitante (AGOSTINHO et al., 2007, 2008). Apesar disto, bacias como as dos rios das Cinzas e Laranjinha, integrantes da bacia do rio Paranapanema, ainda exibem bons níveis de conectividade e um grande número de pequenos tributários. Estudos prévios da ictiofauna destas drenagens (MATOSO et al., 2010; COSTA et al., 2013; GALINDO, 2014) têm destacado espécies de peixes com grande potencial para este tipo de estudo. Adicionalmente, o rio Laranjinha e o rio das Cinzas são de grande importância histórico-ambiental para a região (MAACK, 2002).

### **2.3. *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911)**

*Hypostomus ancistroides* (Ihering 1911), popularmente conhecido como cascudo, possui ampla distribuição nas bacias hidrográficas da região Neotropical (WEBER, 2003; FERRARIS, 2007). Pertence à ordem Siluriformes, família Loricariidae e sub-família Hypostominae, com tamanho variando de pequeno a médio porte, de modo geral, morfologicamente apresentam corpo recoberto de placas ósseas, boca ventral, com dentes dérmicos (odontóides), bexiga natatória reduzida e envolta por uma cápsula óssea ligada à parte posterior do crânio e são característicos por possuírem um pedúnculo caudal alto que os diferenciam das outras subfamílias do grupo (BRITSKI; SILIMON; LOPES, 1999).

Os Loricariidae são a maior família de Siluriformes do mundo (REIS; KULLANDER; FERRARIS JR, 2003). Atualmente, o gênero *Hypostomus* possui 150 espécies válidas

(ESCHMEYER; FRICKE; VAN DER LAAN, 2017), porém, algumas espécies desse gênero possuem um *status* taxonômico um tanto incerto e isso, muito provavelmente, é causado pela sua alta variabilidade intraespecífica na morfologia; principalmente, nos padrões de coloração, que podem tornar sua identificação difícil, levando a descrição de novos táxons, quando na verdade, geneticamente pode se tratar da mesma espécie (WEBER, 2003).

Particularmente, a espécie *H. ancistroides* possui corpo castanho (Figura 1), com várias pintas escuras concentradas nas nadadeiras e região dorsal (GRAÇA; PAVANELLI, 2007). Sua dieta consiste principalmente de sedimentos grossos e finos, diatomáceas, hifas de fungo, alga verde, *Tecamoebas* e restos de matéria orgânica (VILLARES-JUNIOR et al., 2016). Começa sua atividade de forrageio no início da noite, principalmente junto às margens, sobre galhos e troncos submersos (CASATTI, 2003). Apresentam hábitos bentônicos e noturnos, com comportamento não migratório (AGOSTINHO et al., 2007).



**Figura 1** - Exemplar de *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) coletado no rio Laranjinha. Número de registro 10548 – CP: 11,0 cm (FOTO: Galindo, 2014).

Foi observada uma grande plasticidade ambiental dessa espécie, pois esta ocorre tanto em ambientes com melhor integridade ambiental, até ambientes com alta incidência de impactos antrópicos, sejam trechos superiores de rios e ribeirões até os trechos mais à jusante (CASATTI, 2003; CASATTI, 2004; CASATTI, 2005), ou até mesmo, em ribeirões urbanos (SOFIA et al., 2008; VIEIRA; SHIBATTA, 2007).

Possui ampla distribuição e abundância em diferentes drenagens da bacia do alto rio Paraná, principalmente ribeirões, sendo registrada com uma das espécies mais frequentes desta bacia (SHIBATTA; CHEIDA, 2003; CASATTI, 2005; VIEIRA; SHIBATTA, 2007; COSTA et. al., 2013). Como já dito, *H. ancistroides* é uma espécie de hábito não migratório (AGOSTINHO et al., 2007) e tal comportamento pode facilitar o entendimento da estrutura

populacional, padrões de dispersão e histórias únicas de vida (ADAMSON; HURWOOD; MATHER, 2012; FERREIRA et al., 2015), tornando-se, assim, um bom modelo para o estudo da diversidade e estrutura genética de peixes dentro de ribeirões neotropicais (ARAÚJO; SANTOS, 2001; CASTRO et al., 2003, 2004; SHIBATTA; SILVA-SOUZA, 2008).

#### **2.4. Genética da Conservação e Marcadores Moleculares**

No começo da década de 1980, “diversidade biológica” era sinônimo de riqueza de espécies; porém, em 1986, a expressão expandiu-se para o sentido de diversidade genética, riqueza de espécies e diversidade ecológica. A diversidade de espécies é um componente fundamental para a manutenção dos ecossistemas e dos ambientes naturais. Enquanto que a diversidade genética é a variabilidade presente no conjunto de indivíduos da mesma espécie e é o fator que permite aos seres vivos se adaptar e sobreviver (BENSUSAN, 2008).

Populações que possuem um estoque de variação genética têm muitas vantagens adaptativas. Quanto maior o número de alelos, maiores as chances de conter genótipos capazes de suportar mudanças estacionais e/ou temporais, maximizando, desse modo, as oportunidades de sobrevivência de variedades particulares (SODRÉ; ALMEIDA; CHIARI, 2002). O endocruzamento e a perda da diversidade genética são inevitáveis em populações pequenas de espécies que se encontram ameaçadas. Estas quando submetidas a um isolamento sofrem endogamia acelerada, resultando no aumento dos níveis de homozigose e na exposição de alelos recessivos deletérios. Em curto prazo isso reduz a reprodução e a sobrevivência e em longo prazo, diminui a capacidade das populações de evoluírem em resposta às mudanças ambientais, aumentando o risco de extinção (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

O entendimento da distribuição genética é essencial tanto para a compreensão de aspectos biológicos e/ou evolutivos quanto para a conservação das espécies (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010; GEIST, 2011). Uma vez que o potencial adaptativo evolutivo de uma espécie é diretamente influenciado pela diversidade genética, esforços de conservação buscam preservar o máximo de diversidade genética dentro e entre populações. Para tanto, no que se refere às populações de peixes de água doce, é preciso levar em consideração a organização genética dentro e entre as bacias, bem como as possíveis relações entre destruição ambiental, perda de variabilidade genética e subdivisão dos estoques (SOULÉ; SIMBERLOFF, 1986; HILSDORF et al., 2006; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

A genética da conservação se revela uma ciência útil para o trabalho de profissionais interessados na conservação da biodiversidade e dos recursos naturais, tendo como objetivo

central o estudo da biodiversidade molecular nas populações naturais das espécies sob impacto antropogênico. Abordagens de estruturas genéticas populacionais por meio de técnicas moleculares, talvez seja a parte mais importante da genética da conservação e, tem sido útil tanto no estudo de populações exploradas comercialmente, como nas espécies já ameaçadas de extinção (SOLÉ-CAVA; MATIOLI, 2001).

No caso de populações de peixes de água doce, o conhecimento da estrutura e diversidade genética tem sido obtido com sucesso a partir do uso de diversos tipos de marcadores moleculares (PIORSKI et al., 2008), mas principalmente, a partir do uso da técnica de amplificação de DNA via PCR, à exemplo dos marcadores RAPDs, microssatélites e do sequenciamento direto de trechos do genoma mitocondrial (SOFIA et al., 2008; CALCAGNOTTO; DESALLE, 2009; MATSUMOTO; HILSDORF, 2009; GARCEZ; CALCAGNOTTO; ALMEIDA-TOLEDO, 2011; TERCENIO; SCHNEIDER; PORTO, 2012).

#### 2.4.1. Marcadores microssatélites

A técnica de microssatélites é caracterizada pela simplicidade, rapidez e precisão na geração dos perfis genéticos, sendo, ainda, facilmente automatizada. Adicionalmente o DNA a ser utilizado pode ser extraído de qualquer material biológico (PADILHA; GUIMARÃES; PAIVA, 2003).

Basicamente os microssatélites são repetições curtas em tandem (STR - *short tandem repeats*) ou sequências simples repetidas (SSR - *simple sequence repeats*) (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012), constituídas por até 6 bases, encontradas em maior ou menor quantidade no genoma nuclear e em organelas de quase todos os organismos conhecidos (ZANE et al., 2002). Estão presentes em regiões codificantes e não codificantes do DNA e geralmente são caracterizados por um alto grau de polimorfismos, decorrentes de variações no número de repetições do motivo (*motifs*). Além disso, microssatélites apresentam tamanho pequeno, o que facilita a genotipagem por amplificação via PCR (ZANE et al., 2002; CHAMBERS; MACAVOY, 2000).

Esta ferramenta é, atualmente, a mais escolhida para estudos genéticos de populações (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Tal preferência se deve principalmente ao padrão de herança codominante (SUNNUCKS, 2000), alto grau de polimorfismo (ZANE et al., 2002) e ampla distribuição nos cromossomos (DeWOODY; AVISE, 2000), constituindo uma ótima ferramenta para o estudo de diferenciação populacional (O'CONNEL; WRIGHT,

1997).

De fato, microssatélites têm sido a principal ferramenta molecular no estudo genético de peixes de água doce da região Neotropical (PIORSKI et al., 2008), possibilitando grandes contribuições para o conhecimento da diversidade genética, diferenciação populacional e fluxo gênico de muitas espécies, migradoras (HATANAKA et al., 2006; CARVALHO-COSTA; HATANAKA; GALETTI JR, 2008) ou não migradoras (FERREIRA et al., 2015; GALINDO et al., 2015).

Ganho ou perda de repetições durante o processo de replicação do DNA ou de pareamentos incorretos de cromossomos homólogos geram os polimorfismos observados em locos microssatélites. Pareamentos errôneos e crossing-overs desiguais parecem ter um papel importante no surgimento de polimorfismos em microssatélites com repetições maiores que 10 pb, enquanto erros que ocorrem causado pelo deslizamento da enzima DNA Polimerase durante a replicação do DNA, possivelmente, constituem o principal mecanismo na origem de novos alelos microssatélites (ELLEGREN, 2004).

Considerando a dificuldade na definição do padrão mutacional dos microssatélites, foi desenvolvido o modelo *Two Phase Model* (TPM) ou modelo de duas fases. Este modelo tem como base a teoria de coalescência, assumindo diferentes processos mutacionais e a história demográfica na estimativa da variância do número de repetições de um microssatélite. O modelo TPM propõe que a instabilidade dos alelos é devida principalmente ao aumento ou diminuição de uma unidade repetitiva, com probabilidade igual a  $p$ , mas que mutações envolvendo mais de uma unidade repetitiva também podem acontecer, com probabilidade igual a  $1 - p$  (DI RIENZO et al., 1994).

#### 2.4.2. Região *D-loop* do DNA mitocondrial

A célula animal possui uma molécula em dupla fita circular chamada DNA mitocondrial (DNAmt) que é responsável por codificar aproximadamente 5% de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria (o restante é codificado pelo DNA nuclear) (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2012). Inserido no DNAmt encontra-se uma região não codificadora chamada de região controle ou *D-loop* (*displacement loop*), que é um segmento de DNA que marca o início da duplicação da molécula de DNAmt (ANDERSON et al., 1982; AVISE et al., 1986).

O DNA mitocondrial possui herança citoplasmática que é herdada apenas do progenitor feminino, eliminando a ocorrência de eventos de recombinação. Desse modo, a

herança materna e a não recombinação, tornam um genótipo ou haplótipo mitocondrial muito útil no delineamento da genealogia materna ou mesmo filogenia materna, características que tornam essa região muito interessante para análises populacionais e evolutivas (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2012). Outro fator que torna o uso dessa região interessante em estudos genéticos é a facilidade de sua purificação, devido ao seu elevado número de cópias, tamanho pequeno e localização fora do núcleo (AVISE et al., 1984; WILSON et al., 1985).

Curiosamente, apesar da frequência elevada de mutações, os indivíduos normalmente apresentam somente um tipo de molécula de DNAm em todas as células de todos os tecidos. (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2012).

A região controle, não codificante “*D-loop*” é muito interessante para estudos populacionais pois apresenta sequências variáveis que evoluem quatro a cinco vezes mais rápido do que os outros trechos do DNAm (HORAI; HAYASAKA, 1990). E essa taxa mutacional do DNAm, pode ser utilizada para inferir relações filogenéticas entre populações ou espécies com tempos de divergência relativamente recentes entre milhares e alguns milhões de anos (BROWN et al., 1979). E também é comumente utilizada em estudos de diversidade genética (AVISE, 2004), sendo aplicada tanto para estudos de espécies estreitamente relacionadas quanto para a análise de populações de uma mesma espécie (TABERLET, 1996).

Atualmente é recomendado o uso do DNA mitocondrial aliado a um marcador nuclear, a exemplo de microssatélites, pois essa junção possibilita a complementação de informações para ambos os marcadores, consequentemente a obtenção de resultados mais completos (GARCEZ; CALCAGNOTTO; ALMEIDA-TOLEDO, 2011). Em estudos com peixes, a região *D-loop*, tem sido amplamente utilizada em diferentes abordagens genéticas envolvendo diversas espécies de peixes neotropicais (MEYER 1994; SIVASUNDAR et al., 2001; MONTOYA-BURGOS et al., 2003; MARTINS et al., 2003; ABOIM et al., 2005; MATOSO et al., 2010; GARCEZ; CALCAGNOTTO; ALMEIDA-TOLEDO, 2011; TERCENIO; SCHNEIDER; PORTO, 2012).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOIM, M. A.; MENEZES, G. M.; SCHLITT, T.; ROGERS, A. D. Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. **Molecular Ecology**, v.14, p. 1343-1354, 2005.
- ABREU, M. M.; PEREIRA, L. H. G.; VILA, V. B.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the upper Paraguay River Basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 868-873, 2009.
- ADAMSON, E. A. S.; HURWOOD, D. A.; MATHER, P. B. Insights into historical drainage evolution based on the phylogeography of the chevron snakehead fish (*Channa striata*) in the Mekong Basin. **Freshwater Biology**, v. 57, p. 2211–2229, 2012.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p.70-78, 2005.
- AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; PETRY, A. C.; GOMES, L. C.; JÚLIO JR, H. F. Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v.10, p.174–186, 2007.
- AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68(4, Suppl.), p. 1119-1132, 2008.
- ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. University of California Press: Berkeley. CA, USA, p. 388, 2011.
- ANDERSON, S.; DE BRUIJN, M. H. L.; COULSON, A. R.; EPERON, I. C.; SANGER, F.; YOUNG, I. G. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. **Journal of Molecular Biology**, v. 156, p. 683-717, 1982.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. D.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 61-72, 2007.
- ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia Molecular e Evolução**, 2nd ed., Ribeirão Preto, Editora Holos / Sociedade Brasileira de Genética, 2012.
- AVISE, J. C.; NEIGEL, J. E.; ARNOLD, J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. **Journal of Molecular Evolution**, v. 20, p. 99-105, 1984.
- AVISE, J. C.; ELLIS, D. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals [and discussion], *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 312, p. 325-342, 1986.

- AVISE, J. C. **Molecular Barkers, Natural History, and Evolution**, 2nd ed., Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates, p. 684, 2004.
- BALIAN, E. V.; LÉVÊQUE, C.; SEGERS, H.; MARTENS, K. The freshwater animal diversity assessment: an overview of the results. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 627–637, 2008.
- BARLETTA, M.; JAUREGUIZAR, A. J.; BAIGUN, C.; FONTOURA, N. F.; AGOSTINHO, A. A.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. D.; VAL, A. L.; TORRES, R. A.; JIMENES-SEGURA, L. F.; GIARRIZZO, N. N.; FABRÉ, N. N.; BATISTA, V. S.; LASSO, C.; TAPHORN, D. C.; COSTA, M. F.; CHAVES, P. T.; VIEIRA, J. P.; CORRÊA, M. F. M. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 2118-2176, 2010.
- BENSUSAN, N. Perda da Biodiversidade, Conservação de Biodiversidade...Mas o que é Biodiversidade?, In: BENSUSAN, N. **Seria melhor mandar ladrilhar? Biodiversidade: Como, Para que e Por quê**, 2nd ed., p. 22–25, 2008.
- BOULTON, A. J.; BOYERO, L.; COVICH, A. P.; DOBSON, M.; LAKE, S.; PEARSON, R. Are tropical streams ecologically different from temperate streams. In: DUDGEON, D. **Tropical Stream Ecology**, Academic Press, p. 257-284, 2008.
- BRITSKI, H. A.; DE SILIMON, K. Z. D. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**, Brasília: Embrapa-SPI, 1999.
- BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 1967-1971, 1979.
- CALCAGNOTTO, D.; DESALLE, R. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, p. 607-616, 2009.
- CARLSSON, J.; OLSEN, K. H.; NILSSON, J.; OVERLI, O.; STABELL, O. B. Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in stream-living brown trout. **Journal of Fish Biology**, v. 55, p. 1290-1303, 1999.
- CARLSSON, J.; NILSSON, J. Population genetic structure of brown trout (*Salmo trutta L.*) within a northern boreal forest stream. **Hereditas**, v. 132, p. 173-181, 2000.
- CARLSSON, J.; NILSSON, J. Effects of geomorphological structures on genetic differentiation among brown trout populations in a northern boreal river drainage, **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 130, p. 36-45, 2001.
- CARPENTER, S. R.; STANLEY, E. H.; VANDER ZANDEN, M. J. State of the world's freshwater ecosystems: physical, chemical, and biological changes. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 36, p. 75-99, 2011.
- CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; GALETTI JR, P. M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*, **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 377-380, 2008.
- CASATTI, L. Alimentação dos peixes em um riacho do Parque Estadual do Morro do Diabo, bacia do alto rio Paraná, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 2, p. 1-14, 2003.

CASATTI, L. Ichthyofauna of two stream (silted and reference) in the upper Paraná river basin, southeastern Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 757-765, 2004.

CASATTI, L. Fish assemblage structure in a first order stream, southeastern Brazil: longitudinal distribution, seasonality, and microhabitat diversity. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 75-83, 2005.

CASTRO, R. M. C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis causais. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES, N. P. R. **Ecologia de Peixes de Riachos**, Série Oecologia Brasiliensis, Rio de Janeiro, v. 6, p. 139-155, 1999.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; FERREIRA, K. M.; RIBEIRO, A. C.; BENINE, R. C.; DARDIS, G. Z. P.; MELO, A. L. A.; ABREU, T. X.; BOCKMANN, F. A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F. Z.; LIMA, F. C. T. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, p. 1-31, 2003.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 126, p. 455-476, 2000.

COSTA, A. D. A.; FERREIRA, D. G.; SILVA, W. F.; ZANATTA, A. S.; SHIBATTA, O. A.; GALINDO, B. A. Fishes (Osteichthyes: Actinopterygii) from the Penacho stream, upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. **Check List**, v. 9, p. 519-523, 2013.

COVICH, A. P. Geographical and historical comparisons of Neotropical streams: Biotic diversity and detrital processing in highly variable habitats. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 7, p. 361-386, 1988.

CUNICO, A. M.; GRAÇA, W. J.; AGOSTINHO, A. A.; DOMINGUES, W. M.; LATINI, J. D. Fish, Maringá urban streams, Pirapó river drainage, upper Paraná river basin, Paraná State, Brazil. **Check List**, v. 5, p. 273-280, 2009.

DeWOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p. 461-473, 2000.

DI RIENZO, A.; PETERSON, A. C.; GARZA, J. C.; VALDES, A. M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N. B. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 3166-3170, 1994.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.

ENDO, K. S.; MARTINEZ, E. R. M.; ZAWADZKI, C. H.; PAIVA, L. R. S.; JÚLIO-JÚNIOR, H. F. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 34, p. 181-189, 2012.

ESCHMEYER, W. N., FRICKE, R., VAN DER LAAN, R. **Catalog of Fishes: Genera, Species, References**. Disponível em <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>, acesso em 1 fevereiro 2017.

ESTEVEES, K. E.; ARANHA, J. M. R. Ecologia trófica de peixes de riachos. In: CARASMACHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. **Ecologia de Peixes de Riachos**, Série Oecologia Brasiliensis, Rio de Janeiro, v. 6, p. 157-182, 1999.

FERRARIS, J. R. C. J. Checklist of catfishes, recent and fóssil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, p. 1-628, 2007.

FERREIRA, P. C.; CASATTI, L. Integridade biótica de um córrego na bacia do Alto Rio Paraná avaliada por meio da comunidade de peixes. **Biota Neotropica**, v. 6, p. 0, 2006.

FERREIRA, D. G.; GALINDO, B. A.; FRANTINE-SILVA, W.; ALMEIDA, F. S.; SOFIA, S. H. Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. **Conservation Genetics**, v. 16, p. 1-16, 2015.

FERREIRA, D. G.; LIMA, S. C.; FRANTINE-SILVA, W.; SILVA, J. F.; APOLINÁRIO-SILVA, C.; SOFIA, S. H.; CARVALHO, S.; GALINDO, B. A. Fine-scale genetic structure patterns in two freshwater fish species, *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes, Cichlidae) and *Astyanax altiparanae* (Osteichthyes, Characidae) throughout a Neotropical stream. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016.

FLUKER, B. L.; KUHAJDA, B. R.; HARRIS, P. M. The effects of riverine impoundment on genetic structure and gene flow in two stream fishes in the Mobile River basin. **Freshwater Biology**, v. 59, p. 526-543, 2014.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**, 2nd ed., Cambridge, UK: Cambridge University Press, p. 619, 2010.

GALINDO, B. A. **Diversidade de peixes do Rio Laranjinha, Alto Rio Paraná**, 2014. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, fls. 296, 2014.

GALINDO, B. A.; FERREIRA, D. G.; ALMEIDA, F. S.; CARLSSON, J.; SOFIA, S. H. Isolation and characterization of 13 polymorphic microsatellite loci in *Hypostomus ancistroides* (Teleostei: Loricariidae) and cross-amplification in related species. **Journal of Fish Biology**, 2015.

GARCEZ, R.; CALCAGNOTTO, D.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from Rio Grande basin (Brazil), an área fragmented by dams. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 21, p. 268-275, 2011.

GEIST, J. Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. **Ecological Indicators**, v. 11, p. 1507-1516, 2011.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná e Áreas Adjacentes**, Maringá: Eduem, p. 241, 2007.

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

HILSDORF, A. W. S.; MARQUES, D. K. S.; RESENDE, E. K. **Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas**, Embrapa Pantanal, Corumbá, 2006.

HORAI, S.; HAYASAKA, K. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. **American Journal of Human Genetics**, v. 46, p. 828-842, 1990.

IHERING, R. V. Algumas espécies novas de peixes d'água doce (Nematognatha) (*Corydoras*, *Plecostomus*, *Hemipsilichthys*). **Revista do Museu de São Paulo**, v. 8, p. 380-404, 1911.

KELSON, S. J.; KAPUSCINSKI, A. R.; TIMMINS, D.; ARDREN, W. R. Fine-scale genetic structure of brook trout in a dendritic stream network. **Conservation Genetics**, v. 16, p. 31-42, 2015.

LEUZZI, M. S. P.; ALMEIDA, F. S.; ORSI, M. L.; SODRÉ, L. M. K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characiformes), in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 355-362, 2004.

LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M. L. J.; TEDESCO, P. A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 545-567, 2008.

LOPES, C. M.; ALMEIDA, F. S.; ORSI, M. L.; BRITTO, S. G. D. C.; SIROL, R. N.; SODRÉ, L. M. K. Fish passage ladders from Canoas Complex- Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 131-138, 2007.

LUIZ, E. A.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; HAHN, N. S. Ecologia trófica de peixes em dois riachos da bacia do rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, p. 273-285, 1998.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**, 3th ed., Curitiba: Imprensa Oficial, 2002.

MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 33-38: 2003.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia Molecular e Evolução**, 2nd edição, Ribeirão Preto, Editora Holos / Sociedade Brasileira de Genética, 2012.

MATOSO, D. A.; MARTINS, C.; ARTONI, R. F.; GALETTI JR, P. M. Preliminary qualitative analysis on DNAmT in *Astyanax fasciatus* populations Cuvier, 1819 (Teleostei, Characidae) indicate population distinctiveness. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 663-667, 2010.

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

- MEYER, A. DNA technology and phylogeny of fish. In: BEAUMONT, A. R. **Genetics and Evolution of Aquatic Organisms**, Chapman & Hall, London, pp. 219-249, 1994.
- MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1855-1867, 2003.
- NOGUEIRA, M. G. **Composição, abundância e distribuição, espaço-temporal das populações planctônicas e das variáveis físico-químicas na Represa de Jurumirim**. Tese de Doutorado (EESC) Universidade de São Paulo, São Carlos - MG, fls. 439, 1996.
- O'CONNELL, M.; WRIGHT, J. M. Microsatellite DNA in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, p. 331-363, 1997.
- PADILHA, L.; GUIMARÃES, C. T.; PAIVA, E. **Avaliação da pureza genética em sementes de milho utilizando marcadores microsatélites**, Embrapa Milho e Sorgo, 2003.
- PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, O. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, p. 215-225, 2009.
- PHILIPPSEN, J. S.; RENESTO, E.; GEHL, A. M.; ARTONI, R. F.; SHIBATTA, O. A.; ZAWADZKI, C. H. Genetic variability in four samples of *Neoplecostomus yapo* (Teleostei: Loricariidae) from the Paranapanema basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, p. 25-30, 2009.
- PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P. D.; GALETTI JR, P. M. Contribution of conservation genetics in assessing Neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 1039-1050, 2008.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**, Edipucrs, Porto Alegre, p. 742, 2003.
- REIS, R., E.; ALBERT, J., S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M., M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, p. 12-47, 2016.
- RICE, S. P.; ROY, A. G.; RHOADS, B. L. **River confluences, tributaries, and the fluvial network**, John Wiley & Sons, Hoboken, New York, p. 222, 2008.
- SHIBATTA, O. A.; CHEIDA, C. C. Composição em tamanho dos peixes (Actinopterygii, Teleostei) de riachos da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, p. 469-473, 2003.
- SHIBATTA, O. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Fish, Riacho do Feijão basin, São Carlos, São Paulo, Brazil. **Check List**, v. 4, p. 75-78, 2008.
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 407-417, 2001.

- SODRÉ, L. M. K.; ALMEIDA, F. S.; CHIARI, L. Estudos sobre a variabilidade genética de peixes do rio Tibagi através de marcadores moleculares. In: MEDRI, M. E. et al. **A Bacia do Rio Tibagi**, Londrina, cap. 28, p. 531-550, 2002.
- SOFIA, S. H.; SILVA, C. R. M.; GALINDO, B. A.; ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; MARTINEZ, C. B. R. Population genetic structure of *Astyanax scabripinis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. **Hydrobiologia**, v. 553, p. 245-254, 2006.
- SOFIA, S. H.; GALINDO, B. A.; PAULA, F. M.; SODRÉ, L. M. K.; MARTINEZ, C. B. R. Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 317-323, 2008.
- SOULÉ, M. E.; SIMBERLOFF, D. What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves? **Biological Conservation**, v. 35, p. 19-40, 1986.
- STRAYER, D. L.; DUDGEON, D. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 29, p. 344–350, 2010.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, p. 199-203, 2000.
- TABERLET, P. The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. **Molecular genetic approaches in conservation**, p. 125-142, 1996.
- TERENCIO, M. L.; SCHNEIDER, C. H.; PORTO, J. I. R. Molecular signature of the *D-Loop* in the brown pencil fish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 81, p. 110-124, 2012.
- VIANNA, N. C.; NOGUEIRA, M. G. Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas River - an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin. **Brazilian Acta Limnology**, v. 20, p. 117-130, 2008.
- VILLARES-JUNIOR, G. A.; CARDONE, I. B.; GOITEIN, R. Comparative feeding ecology of four syntopic *Hypostomus* species in a Brazilian southeastern river. **Brazilian Journal of Biology**, n. AHEAD, p. 0-0, 2016.
- VIEIRA, C. E. D.; ALMEIDA, M. D. S.; GALINDO, B. A.; PEREIRA, L.; MARTINEZ, C. B. R. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural áreas. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, p. 153-164, 2014.
- VIEIRA, D. B.; SHIBATTA, O. A. Peixes como indicadores da qualidade ambiental do riacho Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 57-65, 2007.
- WEBER, C. Subfamily Hypostominae. In: REIS, R. E ; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, Porto Alegre, Edipucrs, p. 729, 2003.

WILSON, W. D.; WANG, Y. H.; KRISHNAMOORTHY, C. R.; SMITH, J. C. Poly (dA), cntdot, poly (dT) exists in an unusual conformation under physiological conditions: propidium binding to poly (dA), cntdot, poly (dT) and poly [d (AT)], cntdot, poly [d (AT)]. **Biochemistry**, v. 24, p. 3991-3999, 1985.

WINEMILLER, K. O.; AGOSTINHO, A. A.; CARAMASCHI, E. P. Fish ecology in tropical streams. In: DUDGEON, D. **Tropical stream ecology**, Academic Press, p. 107-146, 2008.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: A review. **Molecular Ecology** 11, 1-16, 2002.

## OBJETIVOS

### 3.1. Objetivos Gerais

Investigar a estrutura e diversidade genética de subpopulações do peixe *Hypostomus ancistroides* ao longo de ribeirões de uma bacia hidrográfica do alto rio Paraná.

### 3.2. Objetivos Específicos

- Coletar um  $N$  amostral suficiente de *H. ancistroides* em ribeirões afluentes do rio Laranjinha, considerando trechos do alto, médio e baixo, amostrando dois ribeirões, um de cada margem, em cada seção da bacia principal;
- Analisar o DNA das subpopulações amostradas a partir do sequenciamento do trecho *D-Loop* do DNA mitocondrial (DNAMt) e genotipagem de regiões microssatélites do DNA nuclear (DNAnu);
- Estimar os padrões de fluxo gênico e possíveis fatores evolutivos entre as subpopulações da espécie em estudo;
- Compreender os fatores que são responsáveis pela organização da diversidade genética da espécie em cada ribeirão, observando se existem padrões similares e, assim, contribuir para futuras medidas de manejo visando à conservação das subpopulações estudadas.

**TRABALHO****3.3. Capítulo 1****ESTUDO DE PADRÕES DE ESTRUTURA GENÉTICA EM  
FINA ESCALA E HETEROGENEIDADE NA DISTRIBUIÇÃO  
GENÉTICA DE UM CASCUDO NEOTROPICAL**

Este trabalho será submetido à revista *Freshwater Biology*

**Estudo de padrões de estrutura genética em fina escala e heterogeneidade na distribuição genética de um cascudo Neotropical**

CAROLINE APOLINÁRIO-SILVA<sup>\*</sup>, DHIEGO G. FERREIRA<sup>§</sup>, BRUNO A. GALINDO<sup>§</sup>,  
AND SILVIA H. SOFIA<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA), Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, PR, Brasil

<sup>§</sup> Laboratório de Genética e Conservação (GECON), Universidade Estadual do Norte Paraná, Cornélio Procópio, PR, Brasil

\*Correspondência: Caroline Apolinário da Silva, Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA), Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, PR, Brasil

E-mail: carolapolinario07@gmail.com

Título curto: Genética populacional de *Hypostomus ancistroides* em ribeirões do alto rio Paraná

**Palavras-chave:** peixes neotropicais, cascudo, ribeirões, DNA mitocondrial, microssatélites

## Resumo

1. Ribeirões são responsáveis por grande parte das espécies de peixes de água doce da região Neotropical, fornecendo condições particulares quando comparadas com drenagens de maior porte. Ao mesmo tempo, características intrínsecas também fazem com que ribeirões sejam ambientalmente muito sensíveis.
2. Deste modo, a condução de estudos nestes ambientes tem sido algo essencial dentro do atual cenário de degradação de ecossistemas de água doce. Vários estudos têm buscado compreender a composição ictiofaunística destas drenagens, porém, poucos estudos têm visado compreender a distribuição genética das espécies, o que é de extrema importância para a compreensão de aspectos evolutivos e para propostas de conservação.
3. A partir disto, o presente estudo analisou locos microssatélites e haplótipos mitocondriais (*D-Loop*) de *Hypostomus ancistroides*, uma espécie de peixe amplamente distribuída na calha principal e em ribeirões da bacia do rio Laranjinha, buscando informações sobre os níveis de variação e padrões de diferenciação populacional. Foram selecionados seis ribeirões, dois em cada seção da bacia (alto, médio e baixo) e em cada um deles foram amostrados três pontos, alto, médio e baixo.
4. Os resultados revelaram uma estruturação genética significativa dentro e entre ribeirões. Os níveis de diversidade genética foram similares a outros trabalhos para a mesma espécie (*D-loop*: 0,652, microssatélites: 0,644). Dos 23 haplótipos obtidos onze foram encontrados somente em ribeirões e um total de 36 alelos microssatélites foram exclusivos para as amostras dos ribeirões.
5. De modo geral, os dados mostraram que a diversidade genética de *H. ancistroides* é heterogeneamente distribuída ao longo da bacia do rio Laranjinha, existindo parcelas particulares da diversidade em cada um de seus pequenos afluentes e também indicam um padrão de estruturação genética em pequena escala para os ribeirões estudados.
6. Assim, além de contribuir para um melhor entendimento das influências da biologia de *H. ancistroides* sobre seus aspectos evolutivos e distribuição na bacia, os resultados do presente estudo também apontam para o fato de que a preservação de ribeirões é essencial para a preservação de toda a diversidade genética de uma espécie amplamente distribuída.

## Introdução

Dentre os ambientes da região Neotropical, os ecossistemas continentais de água doce são um dos mais diversos, abrigando uma grande concentração de vertebrados e invertebrados aquáticos (Balian *et al.*, 2008). Grande parte destas espécies é representada por peixes, constituindo a ictiofauna de água doce mais diversa do mundo, com uma estimativa de 8000 a 9000 espécies existentes (Lévêque *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2016). A maior parte desta diversidade de peixes se encontra em território brasileiro (cerca de 2.500 espécies), onde as águas continentais formam a rede hidrográfica mais extensa do mundo (Graça & Pavanelli, 2007). Interessantemente, aproximadamente metade desta fauna é composta por peixes de pequeno porte, os quais habitam principalmente pequenos corpos d'água tais como ribeirões (Castro *et al.*, 1999).

De fato, ribeirões têm sido reconhecidos como drenagens de grande importância para a diversidade da ictiofauna de água doce da região Neotropical (Castro *et al.*, 2003). Em contrapartida, seus baixos volumes de água e a fragilidade de sua fauna de peixes, decorrente principalmente do porte reduzido das espécies, contribuem para que estas drenagens sejam muito sensíveis a alterações ambientais (Luiz *et al.*, 1998). Logo, particularidades físico-químicas e biológicas, tais como as citadas acima, tornam a maior parte dos conhecimentos adquiridos em rios de maior porte inapropriados para o uso em ribeirões (Esteves & Aranha, 1999). Isto tem sido evidenciado a partir de diferentes estudos, incluindo levantamentos de espécies (Shibatta & Silva-Souza, 2008; Cunico *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013) e análises de integridade ambiental (Castro *et al.*, 2003; Vieira & Shibatta, 2007; Vieira *et al.*, 2014). Contudo, as informações genéticas para peixes ao longo destas drenagens ainda são muito limitadas. Os conhecimentos genéticos, a exemplo da distribuição da diversidade genética dentro e entre populações, taxas de fluxo gênico, atuação de eventos demográficos e outros importantes mecanismos envolvidos na história evolutiva de uma espécie, são essenciais para o entendimento de aspectos evolutivos e conservação da biodiversidade em ecossistemas de água doce (Frankham *et al.*, 2010; Geist, 2011).

No caso de ribeirões de regiões temperadas, estudos genéticos de populações de peixes, realizados com base em ferramentas moleculares (marcadores microssatélites e mitocondriais), têm revelado importantes níveis de diversidade genética e padrões de diferenciação populacional (Carlsson *et al.*, 1999; Carlsson & Nilsson, 2000; Kelson *et al.*, 2015). Contudo, embora alguns destes estudos destaquem aspectos genéticos particulares para as populações de ribeirões, tais como diferenciação genética em pequena escala (Carlsson *et al.*, 1999) e manutenção de parcelas particulares de diversidade genética em diferentes

drenagens (Adamson *et al.*, 2012), estes padrões não podem ser extrapolados para drenagens Neotropicais. Os ribeirões temperados e neotropicais são reconhecidos por diferirem em vários aspectos físico-químicos e biológicos (Winemiller *et al.*, 2008). Além disto, abordagens deste tipo ainda são escassas na região Neotropical. Deste modo, fica evidente que estudos devem ser conduzidos para ribeirões da região Neotropicais, buscando entender se os padrões citados acima também se aplicam estas drenagens.

Considerando as características dos sistemas hidrográficos, os conhecimentos sobre estes padrões poderiam ser obtidos a partir de estudos genéticos populacionais de espécies amplamente distribuídas ao longo de vários ribeirões e da calha principal de uma bacia hidrográfica, possibilitando informações robustas e esclarecedoras. Além disto, embora os aspectos geológicos e comportamentais sejam muito importantes na distribuição genética de peixes de água doce (Allan & Flecker, 1993), influências de vários outros fatores, incluindo padrões de colonização na bacia e níveis de interferência antrópica, também são aspectos importantes que devem ser considerados na distribuição genética de peixes em ribeirões (Geist, 2011; Heithaus & Laushman, 1997; Blum *et al.*, 2012).

A bacia do rio Paraná, segunda maior drenagem da América do Sul (Lowe-McConnell, 1999), tem sido um dos principais exemplos da intensidade dos impactos antrópicos em rios e ribeirões neotropicais (Agostinho *et al.*, 2005, 2007). De modo particular, a composição da ictiofauna de ribeirões desta bacia, principalmente no alto rio Paraná, também tem sido uma das melhores estudadas atualmente (Castro *et al.*, 2003; Shibatta & Silva-Souza, 2008; Cunico *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013). Dentro deste sistema hidrográfico, o rio Laranjinha, integrante da bacia do rio Paranapanema (alto rio Paraná), exhibe bons níveis de conectividade e um grande número de pequenos tributários, apresentado assim, boas condições para um desenho experimental visando a distribuição genética de uma espécie ao longo de uma bacia hidrográfica. Oportunamente, estudos prévios da ictiofauna destas drenagens têm destacado espécies de peixes com grande potencial para este tipo de estudo, a exemplo do cascudo *Hypostomus ancistroides*, presente tanto nos ribeirões como na calha principal (Costa *et al.*, 2013; Galindo, 2014).

A espécie *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911), da ordem dos Siluriformes, família Loricariidae e subfamília Hypostominae, é uma espécie amplamente distribuída ao longo da bacia do rio Paraná (Eschmeyer *et al.*, 2017), ocupando diferentes tipos de drenagens (Casatti, 2005; Shibatta *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2013). Em decorrência do comportamento não migratórios desta espécie, estudos argumentam sobre a propensão desta em exibir algum grau de divergência genética entre populações coespecíficas (Endo *et al.*, 2012), o que

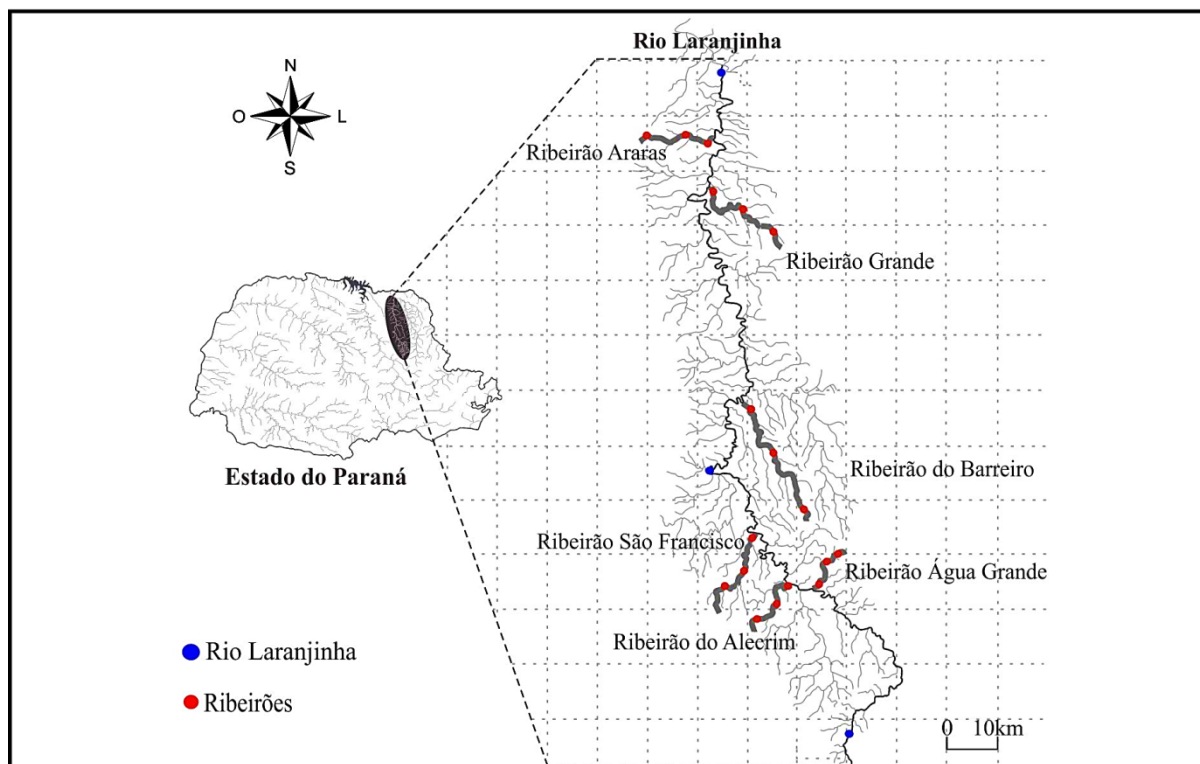
fortalece a escolha desta espécie para este estudo. Outros estudos, tais como Sofia *et al.*, 2008, Zawadzki *et al.*, 2005 e Hollanda-Carvalho *et al.*, 2016, também sugerem uma capacidade de deslocamento limitada para essa espécie. Estudos, tais como os citados acima, tem sido realizado com eficiência na atualidade a partir do uso de marcadores moleculares, incluindo análises de locos microssatélites e análises do DNA mitocondrial (DNAmt) (Ferreira *et al.*, 2015, 2016b).

Considerando os argumentos apresentados, o presente estudo empregou locos microssatélites e sequenciamento parcial da região *D-loop* do DNAmt em uma ampla análise genética de populações de *H. ancistroides* na bacia do rio Laranjinha, incluindo trechos dentro de ribeirões e ao longo da calha principal. Assim, buscou-se informações sobre o padrão de distribuição da diversidade genética, estrutura populacional e fluxo gênico, tentando elucidar se padrões de estrutura genética em curtas distancias geográficas e manutenção de parcelas particulares de diversidade genética também podem ocorrer para ribeirões Neotropicais. Dessa maneira os dados do presente estudo auxiliam no entendimento da organização da diversidade da espécie ao longo da bacia e podem contribuir para futura ações de manejo e conservação de ribeirões, que embora muito importantes para a ictiofauna da região Neotropical, são pouco privilegiados por ações de preservação e tem sofrido sofrem constantes impactos antrópicos.

## **Métodos**

### *Área de Estudo*

Foram selecionados seis ribeirões afluentes do rio Laranjinha, alto rio Paraná, cada par representando uma seção da bacia (alto, médio e baixo) tanto na margem esquerda quanto na direita. Assim, tendo o rio Laranjinha (Lar) como a calha principal e seguindo o sentido da nascente para a foz, da margem esquerda para a direita, as coletas foram realizadas nos seguintes ribeirões: Água Grande (Agr), do Alecrim (Ale), São Francisco (SFr), do Barreiro (Bar), Araras (Ara) e Grande (Gde) (Figura 1). Em cada ribeirão foram amostrados três trechos: um próximo a cabeceira (alto), um no trecho médio e um na foz (baixo). As coordenadas geográficas e distância entre os trechos dentro de cada drenagem é mostrada na Tabela 1.



**Fig. 1** Mapa mostrando os pontos de amostragem *Hypostomus ancistroides* na calha principal e nos ribeirões afluentes do rio Laranjinha (Fonte: modificado de Google Earth, 2016). Em azul, trechos do alto, médio e baixo rio Laranjinha, em vermelho, trechos do alto, médio e baixo dos ribeirões.

**Tabela 1** Extensão do rio Laranjinha e dos seis ribeirões selecionados para o estudo, pertencentes à bacia hidrográfica do alto rio Paraná, Brasil. São apresentadas as coordenadas geográficas de cada trecho amostrado, a distância entre os trechos amostrados dentro de cada drenagem. Cód. = abreviação do nome dos ribeirões seguido pela seção amostrada, <sup>A</sup> = Alto, <sup>M</sup> = Médio e <sup>B</sup> = Baixo; N = número de *H. ancistroides* coletado em cada ponto.

Drenagens	Extensão (Km)	Cód.	Coordenadas Geográficas	Distância entre os trechos (Km)
Rio Laranjinha	350,0	Lar <sup>A</sup>	24°13'24,56"S - 50°11'57,88"O	Alto x Médio = 166,87
		Lar <sup>M</sup>	23°43'31,88"S - 50°26'34,42"O	Médio x Baixo = 182,0
		Lar <sup>B</sup>	23°01'53,90"S - 50°26'51,90"O	Baixo x Alto = 348,87
Ribeirão do Alecrim	23,4	Ale <sup>A</sup>	24°01'14,31"S - 50°21'36,44"O	Alto x Médio = 7,4
		Ale <sup>M</sup>	23°59'11,63"S - 50°20'16,61"O	Médio x Baixo = 12,4
		Ale <sup>B</sup>	23°57'01,54"S - 50°18'41,78"O	Baixo x Alto = 19,8
Ribeirão Água Grande	19,8	Agr <sup>A</sup>	23°53'58,76"S - 50°13'28,75"O	Alto x Médio = 4,5
		Agr <sup>M</sup>	23°54'47,61"S - 50°14'36,47"O	Médio x Baixo = 10,3
		Agr <sup>B</sup>	23°57'09,85"S - 50°15'35,66"O	Baixo x Alto = 14,8
Ribeirão São Francisco	30,9	SFr <sup>A</sup>	23°57'33,05"S - 50°26'55,72"O	Alto x Médio = 8,3
		SFr <sup>M</sup>	23°56'10,26"S - 50°24'34,12"O	Médio x Baixo = 14,3
		SFr <sup>B</sup>	23°52'12,23"S - 50°23'16,24"O	Baixo x Alto = 22,6
Ribeirão do Barreiro	51,8	Bar <sup>A</sup>	23°47'38,62"S - 50°17'58,80"O	Alto x Médio = 17,6
		Bar <sup>M</sup>	23°43'02,07"S - 50°20'41,84"O	Médio x Baixo = 23,3
		Bar <sup>B</sup>	23°38'44,97"S - 50°23'32,32"O	Baixo x Alto = 40,9
Ribeirão Araras	19	Ara <sup>A</sup>	23°09'30,59"S - 50°35'28,47"O	Alto x Médio = 8,9
		Ara <sup>M</sup>	23°09'37,03"S - 50°31'24,56"O	Médio x Baixo = 5,1
		Ara <sup>B</sup>	23°09'59,04"S - 50°28'57,34"O	Baixo x Alto = 14
Ribeirão Grande	31	Gde <sup>A</sup>	23°19'53,93"S - 50°20'44,34"O	Alto x Médio = 12,6
		Gde <sup>M</sup>	23°17'24,19"S - 50°24'30,87"O	Médio x Baixo = 14,6
		Gde <sup>B</sup>	23°16'00,70"S - 50°27'58,06"O	Baixo x Alto = 27,2

### *Amostragem dos peixes*

Um total de 508 espécimes de *Hypostomus ancistroides* foi obtido para a análise ao longo dos ribeirões, variando de 18 a 33 indivíduos por amostra (Tabela 1). A coleta dos exemplares foi realizada utilizando peneiras e redes de espera (2mm e 4mm), com um esforço de coleta mínimo de uma hora por ponto, amostrando aproximadamente 300 metros a partir do ponto de partida. Os peixes coletados foram eutanasiados em solução de óleo de cravo (3.000 mg/L) como sugerido por Lucena *et al.* (2013), garantindo uma morte rápida e indolor. Após a constatação da morte, os espécimes foram armazenados em álcool 70% para conservação do material genético.

Subsequentemente, amostras de musculatura e nadadeira raiada foram retiradas, armazenadas em microtubos com álcool 70% e mantidas a -20 °C. Exemplares foram fixados em formol 10%. Alguns exemplares serão depositados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL).

Dados genéticos de *H. ancistroides* em três trechos do rio Laranjinha, alto, médio e baixo, também foram incluídas no presente estudo a partir de informações provenientes do trabalho de Galindo (2014), o qual estudou a espécie em sete pontos ao longo de toda a calha principal deste rio. Deste modo, as amostras provenientes do rio Laranjinha receberam os seguintes códigos: Lar<sup>A</sup>, que corresponde as amostras coletadas na porção alta do rio; Lar<sup>M</sup>, correspondendo as amostras coletadas mais próximas a porção média do rio; e Lar<sup>B</sup>, que corresponde as amostras coletadas mais próximos a porção baixa do rio.

Exemplares dos espécimes incluídos nas análises estão depositados na Coleção de Peixes do Laboratório de Genética e Conservação (GECON), da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP de Cornélio Procópio), sob a coordenação do Dr. Bruno A. Galindo. Este material fez parte das amostragens realizadas durante o desenvolvimento da Tese de Doutorado do referido pesquisador, atualmente colaborador do nosso Laboratório (Galindo, 2014).

### *Extração e Quantificação do DNA*

O DNA genômico foi obtido a partir da musculatura empregando o protocolo baseado em fenol/clorofórmio proposto por Almeida *et al.* (2001). A concentração do DNA foi determinada a partir de espectrofotometria pelo Nanodrop 2000c UV-Vis (Thermo Science) e posteriormente diluídas em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) para 5 ng/μL.

### *Marcadores Microsatélites*

Para a análise de microssatélites foram selecionados nove locos dentre os treze previamente descritos para *H. ancistroides* por Galindo *et al.* (2015). As condições de amplificação seguiram o protocolo sugerido por Ferreira *et al.* (2013). A genotipagem foi realizada segundo a metodologia de Schuelke (2000), na qual o *primer Forward* possui uma sequência adicional M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') na extremidade 5', possibilitando a marcação dos produtos de PCR com fluorescências.

As reações de PCR foram determinadas em um volume final de 10 µL contendo 1X GoTaq Green Master Mix (Promega), 10 ng da amostra de DNA, 1% de glicerol, 0,125 µM de *primer* M13 marcado com fluorescência (FAM, HEX, NED ou PET, Applied Biosystems, CA), 0,125 µM de *primer Reverse*, 0,0125 µM de *primer Forward* e água ultrapura para completar o volume final. As amplificações foram conduzidas por um passo de desnaturação inicial de 94 °C por 4 min, seguido por 10 ciclos de 94 °C por 30 s, (temperatura de anelamento de cada *primer*, variando de 48°C a 60°C) por 1 min e 72 °C por 1 min, 25 ciclos de 89 °C por 30 s, (temperatura de anelamento de cada *primer*, variando de 48°C a 60°C) por 1 min e 72 °C por 1 min com uma extensão final de 72 °C por 30 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático ABI-PRISM 3500 xL (Applied Biosystems), usando o GeneScan 600 Liz (Applied Biosystems) como marcador de peso molecular. A leitura dos genótipos se deu através do programa GeneMarker 1.85 (SoftGenetics, State College, PA) a partir de checagem manual.

### *Marcador de DNAm (D-loop)*

Parte da região controle do DNA mitocondrial foi amplificada utilizando os *primers* DLA-III 5'-TAT TTA AAG RCA TAA TCT CTT GAC -3' e HygDL-R 5'- WTG CKA RTA TGT GCC GYY TG -3' (Cardoso *et al.*, 2011), anteriormente utilizados para outras espécies do gênero *Hypostomus*. As condições de amplificação foram realizadas segundo Galindo *et al.* (2015).

A reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 1X GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 µM de cada *primer*, 15 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume. As amplificações foram conduzidas com um ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 e 72°C por 2 min, e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados com a enzima IllustraExoStar IT® (GE) e utilizados nas reações de sequenciamento. As reações de

sequenciamento por sua vez foram realizadas independentemente para ambas as fitas (*H* e *L*) empregando o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante, com posterior leitura em sequenciador automático ABI-PRISM 3500 XL (Applied Biosystems).

A análise da qualidade das sequências e geração dos *contigs* foi realizada a partir do aplicativo online Electropherogram Quality Analysis (Togawa & Brigido, 2003), o alinhamento feito pelo aplicativo MUSCLE (Edgar, 2004) no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). E para a confirmação da origem do fragmento, as sequências foram submetidas a uma busca no BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al.*, 1990). As sequências dos diferentes haplótipos encontrados serão depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

#### *Análise dos Dados*

Como já salientado, para todas os testes realizados incluímos as amostras do rio Laranjinha cedidas pelo Dr. Bruno Ambrozio Galindo.

Assim, um total de 21 subpopulações foram analisadas. No intuito de se verificar uma possível estruturação em fina escala e diversidade particular contida em cada ribeirão, e considerando-se o comportamento não migrador dessa espécie, cada ponto amostrado foi considerado inicialmente como uma subpopulação, tanto para as análises de diversidade como para as análises de estruturação populacional. Contudo, posteriormente, neste último caso foi necessário o agrupamento das subpopulações, assim, as três subpopulações (Alto, Médio e Baixo) de cada ribeirão foi considerada como um grupo. No total, nas comparações entre rio e ribeirões, são considerados sete grupos (ou amostras), sendo seis dos ribeirões e um grupo do rio Laranjinha.

Nas análises dos marcadores microssatélites as subpopulações amostradas no ribeirão Alecrim não foram incluídas devido a uma falha técnica.

#### *Diversidade Genética*

Para análise das sequencias mitocondriais foram empregados os programas, DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009), para calcular a diversidade haplotípica (*h*) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005), para identificar sítios polimórficos, determinar haplótipos e estimar a frequências dos haplótipos. Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd - <http://www.fluxus-engineering.com>), para a construção da rede de haplótipos dos dados de DNAm, baseado no algoritmo *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999)

Para análises dos locos microssatélites inicialmente foi utilizado o programa Micro-Checker 2.2.1 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), para testar a eventual presença de alelos nulos ou outros erros de genotipagem, como alelos *dropout* e erros de leitura em virtude de picos *stutter*.

Em seguida foram empregados os programas POPGEN v. 1.31 (Yeh *et al.*, 2000), para calcular a quantidade de alelos ( $A$ ), a média de alelos por loco ( $\bar{N}_A$ ), número de alelos efetivos ( $\bar{N}_E$ ) número de alelos privados ( $N_p$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_E$ ). Fstat v2.9.3 (Goudet, 2001), para estimar a riqueza alélica e o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) por população. Genepop v.1.2 (Raymond & Rousset, 1995), foi utilizado para testar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação entre os pares de locos, com a significância (valor de  $P$ ) posteriormente ajustada através da correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989).

#### *Análises Demográficas*

Para os haplótipos mitocondriais foi utilizado o programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005) para analisar a distribuição de diferenças par a par (*mismatch distribution*) e testar a neutralidade seletiva, empregando o modelo de sítios infinitos de Tajima ( $D$ ) (Tajima, 1989) e Fu ( $F_s$ ) (FU, 1997), os quais também fornecem bons indicativos da ocorrência de eventos demográficos, como *bottlenecks* e expansões populacionais (Garcez *et al.*, 2011).

Para os dados de microssatélite foi utilizado o programa Bottleneck 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996), para verificar evidências de possíveis reduções recentes no tamanho populacional das amostras, utilizando a análise do excesso ou deficiência de heterozigosidade a partir dos modelos evolutivos para locos de microssatélites Infinite Alleles Model (*IAM*), Two-Phase Model (*TPM* – com 90% *SMM* e 10% *IAM*) e Stepwise Mutation Model (*SMM*). O teste de “*Wilcoxon sign-rank*” (Luikart & Cornuet, 1998) foi empregado para avaliar o nível de significância do excesso ou deficiência de heterozigosidade apresentado para cada modelo, considerando  $P \leq 0,05$ .

#### *Estrutura Genética*

Previamente a Análise de Variância Molecular (AMOVA) os haplótipos mitocondriais foram submetidos ao programa JModelTest2 (Darriba *et al.*, 2012), que selecionou o modelo de substituição nucleotídica de Tamura e Nei (1993) pelo critério de informação Akaike (AIC) (Akaike, 1998).

Para ambos os marcadores, foi utilizado o programa, Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005) para análise da AMOVA (Análise da Variância Molecular), usada para estimar a partição da variação genética dentro e entre as subpopulações. A partir da AMOVA também foram calculadas a diferenciação genética entre as amostras (Excoffier *et al.*, 1992), utilizando o índice  $\Phi_{ST}$  (Weir & Cockerham, 1984), nas comparações par a par.

Para os dados de microssatélite foi utilizado o programa Structure v.2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) para avaliar a relação entre as amostras a partir de agrupamentos Bayesianos. Para isso foi empregado o modelo *admixture*, modelo que assume que os indivíduos podem ter ancestralidade mista, com contribuições genóticas de diferentes populações (Pritchard *et al.*, 2000). As estimativas de K (número de agrupamentos) foram realizadas em simulações variando com o número de populações estudadas, reproduzindo 20 corridas para cada valor de K, segundo a metodologia de Evanno *et al.* (2005), com 10.000 interações no “burn-in” e 100.000 interações na Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). Adicionalmente o programa Structure Harvester 0.6.7 (Earl, 2011) foi utilizado para ordenar os resultados e inferir estatisticamente qual o K mais provável da análise usando a estatística  $\Delta K$  (Evanno *et al.*, 2005).

### *Fluxo Gênico*

Para os dados de microssatélite foram utilizados os programas Bayesass 1.3 (Wilson & Rannala, 2003), para análise Bayesiana de fluxo gênico, utilizando o programa para inferir taxas de migrações recentes e a direção da migração entre os trechos de amostragem.

## Resultados

### *Diversidade Genética*

Dos 518 indivíduos analisados um total de 181 alelos microssatélites diferentes foram obtidos, com uma média de 69 alelos por amostra (Tabela 2). Com exceção do loco Hanc 01, que foi monomórfico para as amostras Agr<sup>A</sup>, Agr<sup>M</sup> e Agr<sup>B</sup>, todos os locos foram polimórficos para todas as amostras.

A amostra Agr<sup>A</sup>, que corresponde a porção alta do ribeirão mais próximo da nascente do rio Laranjinha, apresentou os menores valores de diversidade genética, incluindo número de alelos ( $A = 41$ ), média de alelos por loco ( $N_A = 4,556$ ), média de alelos efetivos por loco ( $N_E = 2,615$ ), assim como heterozigosidade observada ( $H_O = 0,521$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_E = 0,529$ ). Enquanto que os maiores valores de diversidade foram encontrados em mais de uma amostra, onde SFr<sup>M</sup> apresentou a maior quantidade de alelos ( $A = 84$ ), a maior média de alelos por loco ( $N_A = 9,333$ ) e o maior índice de heterozigosidade esperada ( $H_E = 0,736$ ), já a média de alelos efetivos por loco e heterozigosidade observada foram encontradas em Lar<sup>M</sup> ( $N_E = 5,038 - H_O = 0,746$ ) (Tabela 2).

A riqueza alélica ( $R_A$ ) foi corrigida para um tamanho amostral de 17 indivíduos diplóides e apresentou valores variando de 8,09 (Bar<sup>M</sup>) a 4,18 (Ara<sup>A</sup>). O número de alelos privados ( $N_P$ ) variou de zero (Agr<sup>A</sup>, Agr<sup>M</sup>, Agr<sup>B</sup>, SFr<sup>A</sup>, Bar<sup>B</sup>, Ara<sup>A</sup> e Gde<sup>A</sup>) a 11 (SFr<sup>M</sup>). Somente a amostra Ara<sup>B</sup> apresentou valores significativos para o coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  (Tabela 2).

Alguns locos permaneceram com desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ( $P < 0,05$ ) mesmo após a correção sequencial de Bonferroni, sendo eles, Hanc 6 (SFr<sup>M</sup>), Hanc 9 (Lar<sup>M</sup>), 32 (Lar<sup>A</sup>, Bar<sup>M</sup>, Ara<sup>M</sup>, Ara<sup>B</sup>, Gde<sup>B</sup>) e Hanc 184 (SFr<sup>M</sup>) (Tabela 3). Apenas três amostras apresentaram pares de *primers* em desequilíbrio de ligação após a correção sequencial de Bonferroni, na amostra Lar<sup>A</sup> (Hanc 2 x Hanc 184, Hanc 143 x Hanc 32, Hanc 184 x Hanc 32), SFr<sup>A</sup> (Hanc 184 x Hanc 32) e SFr<sup>M</sup> (Hanc 6 x Hanc 32). Nenhuma das 18 amostras apresentou indicativos de erros de genotipagem devido à presença de “bandas *stutters*” ou “*large allele dropout*”, da mesma maneira nenhuma das amostras indicou presença de alelos nulos.

**Tabela 2** Diversidade genética de *Hypostomus ancistroides* ao longo dos 21 pontos amostrados, obtida a partir de marcadores microssatélites e DNAm.  $N$  – Número de indivíduos analisados,  $A$  – número total de alelos,  $N_P$  – número de alelos privados,  $R_A$  – riqueza alélica,  $N_A$  – número médio de alelos,  $N_E$  – número de alelos efetivos,  $H_O$  – heterozigosidade observada,  $H_E$  – heterozigosidade esperada,  $F_{IS}$  – índice de endogamia,  $EHW^{Hanc}$  – quantidade e identificação de locos com desvios no equilíbrio de Hardy–Weinberg para cada amostra.  $Nh$  – número de haplótipos encontrados,  $h$  – diversidade haplotípica,  $\pi$  – diversidade nucleotídica,  $D$  – teste de neutralidade de Tajima (Tajima, 1989),  $F_S$  – teste de neutralidade de Fu (Fu, 1997) \*Valores significativos  $P \leq 0,05$ .

Amostras	Microssatélite										D-loop					
	$N$	$A$	$N_P$	$R_A$	$\bar{N}_A$	$\bar{N}_E$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$	$EHW^{Hanc}$	$N$	$Nh$	$h$	$\pi$	$D$	$F_S$
Lar <sup>A</sup>	28	62	4	6,134	6,889	3,64	0,602	0,608	-0,009	2 <sup>9,32</sup>	31	4	0,187	0,0004	-1,731*	-3,436*
Lar <sup>M</sup>	30	81	1	7,334	9	5,038	0,746	0,686	-0,078	1 <sup>9</sup>	30	4	0,434	0,0033	-2,439*	2,561
Lar <sup>B</sup>	29	78	2	7,410	8,667	4,667	0,648	0,682	-0,020	1 <sup>32</sup>	33	10	0,805	0,0108	-1,186	1,655
Ale <sup>A</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	2	0,067	0,0001	-1,147*	-1,211
Ale <sup>M</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	1	0	0	0	0
Ale <sup>B</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	3	0,227	0,0004	-1,214	-1,454*
Agr <sup>A</sup>	32	41	0	5,167	4,556	2,615	0,521	0,529	0,040	0	32	3	0,234	0,0006	-0,606	-0,595
Agr <sup>M</sup>	30	48	0	7,289	5,33	2,799	0,587	0,563	-0,061	0	30	4	0,251	0,0007	-1,196	-1,885*
Agr <sup>B</sup>	30	43	0	7,894	4,778	2,676	0,526	0,555	0,007	0	30	4	0,407	0,0011	-0,403	-0,694
SFr <sup>A</sup>	30	68	0	7,739	7,556	4,556	0,736	0,704	-0,046	0	30	2	0,287	0,0042	0,42	6,881
SFr <sup>M</sup>	28	84	11	7,687	9,333	4,484	0,727	0,736	-0,027	2 <sup>6,184</sup>	24	2	0,228	0,0033	-0,474	5,29
SFr <sup>B</sup>	25	74	4	7,127	8,222	4,294	0,655	0,652	-0,030	0	25	4	0,23	0,0004	-1,733*	-3,084*
Bar <sup>A</sup>	29	83	4	6,762	9,222	4,64	0,69	0,666	0,032	0	29	5	0,466	0,0013	-1,769*	-1,518
Bar <sup>M</sup>	31	80	1	8,092	8,889	4,784	0,66	0,679	0,069	1 <sup>32</sup>	30	1	0	0	0	0
Bar <sup>B</sup>	30	73	0	7,294	8,111	4,648	0,68	0,638	0,054	0	30	2	0,331	0,0006	0,485	0,891
Ara <sup>A</sup>	18	56	0	4,184	6,222	3,595	0,607	0,622	0,050	0	18	4	0,523	0,0038	2,395	5,323
Ara <sup>M</sup>	31	78	6	4,566	8,667	4,42	0,69	0,691	0,059	1 <sup>32</sup>	28	5	0,69	0,0068	-1,726*	3,695
Ara <sup>B</sup>	30	79	2	4,431	8,778	4,743	0,654	0,704	0,042*	1 <sup>32</sup>	30	7	0,766	0,0054	-1,895*	1,186
Gde <sup>A</sup>	32	53	0	6,057	5,889	2,951	0,552	0,567	0,072	0	32	4	0,286	0,0007	-1,602*	-1,894*
Gde <sup>M</sup>	29	77	4	7,779	8,556	4,687	0,65	0,686	-0,029	0	29	5	0,47	0,0022	-0,632	-0,205
Gde <sup>B</sup>	26	82	4	7,561	9,111	4,989	0,656	0,701	0,046	1 <sup>32</sup>	26	5	0,702	0,0039	1,054	1,303
<b>Geral</b>	<b>518</b>	<b>181</b>	<b>43</b>	<b>6,695</b>	<b>7,654</b>	<b>4,124</b>	<b>0,644</b>	<b>0,648</b>	<b>0,008</b>	<b>todos os locos</b>	<b>602</b>	<b>23</b>	<b>0,652</b>	<b>0,0026</b>	<b>-1,887*</b>	<b>-7,564*</b>



**Tabela 3** Distribuição dos 23 haplótipos e seus sítios variáveis encontrados entre 602 amostras de *Hypostomus ancistroides* provenientes vinte e uma localidades da bacia do rio Laranjinha, o qual pertence à bacia do alto rio Paraná, Brasil. A última coluna informa quantos haplótipos estão presentes em cada localidade amostrada.

Haplótipos	Nucleotídeos dos Sítios Variáveis	Frequência Absoluta dos Haplótipos																					
		Lar			Ale			Agr			SFr			Bar			Ara			Gde			
		A	M	B	A	M	B	A	M	B	A	M	B	A	M	B	A	M	B	A	M	B	
H01	AATAGCCTTATCGCTCTAAGAAGCATAAGAATC--C-CTCTCTATA	1		3					1									4	9	27	21	12	<b>78</b>
H02	AATAGCCTTATCGCTCTAAGAATCATAAGAATC--C-CTCTCTATA	28	22	13	29	30	22	2	2	3	25	21	22	21	30	24	10	12	11		3	5	<b>335</b>
H03	AATAGCCTCATCGCTCTAAGAATCATAAGAATC--C-CTCTCTATA	1	1						2				1	2									<b>7</b>
H04	AGTAGCCTTATCGCTCTAAGAATCATAAGAATC--C-CTCTCTATA	1	6					2	1	2				4		6							<b>22</b>
H05	AATAAATCTATAGCATTAGAAG-ATCAGGAGCACACTTCTTCCATA		1	1															1				<b>3</b>
H06	AATAGCCTTATCGCTCTAAGAAGCATAAAAATC--C-CTC-CTATA					2													1				<b>3</b>
H07	AATAGCCTTATCGCTCTAAGGAGCATAAGAATC--C-CTCTCTATA				6													1	1				<b>8</b>
H08	GATAAGTCTATAACATCTAGAAGCATAAGAATC--C-CTC-CTACA				1																		<b>1</b>
H09	AATAGCCTTATCGCTCTAAGAAGCATAAGAATC--C-CTC-CTATA				4																		<b>4</b>
H10	AATAAATCTATAGCATTAGAAG-ATCAGGAGCACATTTCTTCCATA				1													1					<b>2</b>
H11	AATAAATCTATCGCATTAGAAG-ATCAGGAGCACATTTCTTCCATA				1																		<b>1</b>
H12	AATAGCCTTATCGCTCTAAGAAGCATAAGGATC--C-CTCTCTATG			1																2			<b>3</b>
H13	AATAGCCTTATCGCTCTAAGAAATCATAAGAATC--C-CTCTCTCTA				1																		<b>1</b>
H14	AACAGCCTTATCGCTCTAAGAATCATAAGAATC--C-CTCTCTATA						2	28	26	23			1							1			<b>81</b>
H15	AATAGCCTTACCGCTCTAAGAATCATAAGAATC--C-CTCTCTATA					1																	<b>1</b>
H16	AATGAATCTATCGCATTAAAGAAACATAAGAATC--C-CTCTCTATA										5	3											<b>8</b>
H17	AATAACCTTATCGCTCTAAGAATCATAAGAATC--C-CTCTCTATA												1										<b>1</b>
H18	AATAGCCTTATCGCTCTAAGGAGCATAAGGATC--C-CTCTCTATG													1			8	10	5		2	1	<b>27</b>
H19	AATAGCCTTCTCGCTCTAAGAATCATAAGAATC--C-CTCTCTATA													1									<b>1</b>
H20	AATAGCCTTATCGCTCTAAGAAGCATAAGAATC--C-CTCTCTATG																		3			1	<b>4</b>
H21	AATAGCCTTATCGATCTAAGAAGCATAAGAATC--C-CTCTCTATA																		1				<b>1</b>
H22	AATAGCCTTATCGCTCTAAGGAGCATGAGAATC--C-CTCTTTATG																				2	7	<b>9</b>
H23	AATAGCCTTATCGCTCTAAGGAGCATAAGGATC--C-CTCTCTATA																						<b>1</b>
		<b>4</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Onze haplótipos (H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, H21, H22 e H23) foram obtidos apenas em amostras dos ribeirões, enquanto que os haplótipos H8, H9, e H11 foram encontrados somente em amostras do rio Laranjinha. O número de haplótipos por local amostrado variou de um (Ale<sup>M</sup> e Bar<sup>M</sup>) a dez (Lar<sup>B</sup>) (Tabela 3).

Considerando todas as amostras, foi encontrado uma diversidade haplotípica ( $h$ ) de 0,652 e uma diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,0026. As amostras Ale<sup>M</sup> e Bar<sup>M</sup> foram as únicas com apenas um haplótipo (H2), logo, apresentaram os índices de diversidade igual a 0. Por outro lado, a amostra de Lar<sup>B</sup> apresentou as maiores diversidades haplotípica e nucleotídica ( $h = 0,805$ ,  $\pi = 0,0108$ ) (Tabela 2).

### Análises Demográficas

Para investigar possíveis ocorrências de *bottlenecks* recentes, foi obtido, no teste IAM, uma deficiência de heteroziguidade em Bar<sup>A</sup> e Ara<sup>A</sup> e um excesso de heteroziguidade em Ara<sup>A</sup>, Ara<sup>M</sup>, Ara<sup>B</sup> e Gde<sup>M</sup>, no teste TPM houve indicativo de deficiência de heteroziguidade em SFr<sup>A</sup> e Bar<sup>M</sup>, por fim, no teste SMM também houve indicativo de deficiência de heteroziguidade nas amostras Sfr<sup>A</sup>, SFr<sup>M</sup>, SFr<sup>B</sup>, Bar<sup>M</sup>, Bar<sup>B</sup>, Ara<sup>M</sup>, Gde<sup>A</sup>, Gde<sup>M</sup> e Gde<sup>B</sup>. Todas as amostras mostraram *normal L-shaped distribution* (Tabela 4).

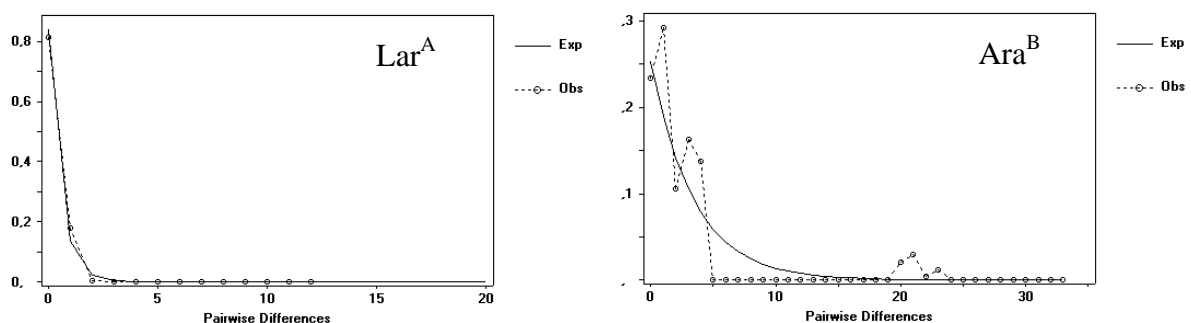
**Tabela 4** Testes de gargalos genéticos recentes (*Bottleneck*) para *Hypostomus ancistroides* nos 18 pontos amostrados. Teste de *Wilcoxon sign-rank* para excesso de heteroziguidade e teste *Mode-shift* para padrões de distribuição das frequências alélicas.  $N$  – Número de indivíduos analisados,  $H_d$  – número de locos exibindo deficiência de heteroziguidade,  $H_e$  – número de loci exibindo excesso de heteroziguidade.

Amostras	$N$	Teste <i>Wilcoxon sign-rank</i>						Distribuição frequência dos alelos
		IAM <sup>a</sup>		TPM <sup>b</sup>		SMM <sup>c</sup>		
		$H_d/H_e$	$P$	$H_d/H_e$	$P$	$H_d/H_e$	$P$	
Lar <sup>A</sup>	28	3/6	0,410	5/4	0,322	6/3	0,126	<i>L-shaped</i>
Lar <sup>M</sup>	30	2/7	0,213	3/6	0,463	8/1	0,004* <sup>d</sup>	<i>L-shaped</i>
Lar <sup>B</sup>	29	2/7	0,210	3/6	0,463	5/4	0,280	<i>L-shaped</i>
Agr <sup>A</sup>	32	3/6	0,361	5/4	0,345	6/3	0,141	<i>L-shaped</i>
Agr <sup>M</sup>	30	1/8	0,055	4/5	0,581	6/3	0,128	<i>L-shaped</i>
Agr <sup>B</sup>	30	2/7	0,194	3/6	0,433	5/4	0,322	<i>L-shaped</i>
SFr <sup>A</sup>	30	3/6	0,440	7/2	0,034* <sup>d</sup>	9/0	0,000* <sup>d</sup>	<i>L-shaped</i>
SFr <sup>M</sup>	28	4/5	0,537	4/5	0,556	7/2	0,030* <sup>d</sup>	<i>L-shaped</i>
SFr <sup>B</sup>	25	3/6	0,414	5/4	0,322	7/2	0,033* <sup>d</sup>	<i>L-shaped</i>
Bar <sup>A</sup>	29	2/7	0,196* <sup>e</sup>	3/6	0,456	5/4	0,274	<i>L-shaped</i>
Bar <sup>M</sup>	31	3/6	0,471	8/1	0,004* <sup>d</sup>	8/1	0,004* <sup>d</sup>	<i>L-shaped</i>
Bar <sup>B</sup>	30	3/6	0,414	6/3	0,134	8/1	0,006* <sup>d</sup>	<i>L-shaped</i>
Ara <sup>A</sup>	18	2/6	0,223* <sup>e</sup>	3/5	0,523	6/2	0,015	<i>L-shaped</i>
Ara <sup>M</sup>	31	1/07	0,080* <sup>e</sup>	5/3	0,196	7/1	0,010* <sup>d</sup>	<i>L-shaped</i>
Ara <sup>B</sup>	30	0/8	0,012* <sup>e</sup>	4/4	0,433	5/3	0,175	<i>L-shaped</i>
Gde <sup>A</sup>	32	4/5	0,592	4/5	0,574	6/3	0,130* <sup>d</sup>	<i>L-shaped</i>
Gde <sup>M</sup>	29	3/0	0,427* <sup>e</sup>	3/6	0,421	8/1	0,006* <sup>d</sup>	<i>L-shaped</i>
Gde <sup>B</sup>	26	2/7	0,212	6/3	0,107	8/1	0,004* <sup>d</sup>	<i>L-shaped</i>

\*d – valores significativos para deficiência de heterozigosidade, \*e – valores significativos para excesso de heterozigosidade ( $P \leq 0,05$ ). Distribuição *normal L-shaped*, a) *Infinite Allele Model*, b) *Two Phase Model* (90% SSM), c) *Stepwise Mutation Model*.

No teste de neutralidade para as sequências mitocondriais foram encontrados poucos valores significativos. As amostras Ale<sup>M</sup> e Bar<sup>M</sup>, que apresentaram apenas um haplótipo cada uma, não obtiveram estimativas para estes testes. Já as amostras Ale<sup>A</sup>, Bar<sup>A</sup>, Ara<sup>M</sup>, Ara<sup>B</sup>, Gde<sup>A</sup>, SFr<sup>B</sup>, Lar<sup>M</sup> e Lar<sup>A</sup> apresentaram valores significativos e negativos para o teste de Tajima ( $D$ ) e as amostras Ale<sup>B</sup>, Agr<sup>M</sup>, Gde<sup>A</sup>, SFr<sup>B</sup> e Lar<sup>A</sup> mostraram valores significativos e negativos para o teste de Fu ( $F_s$ ) (Tabela 2).

Os gráficos de distribuição *mismatch* foram gerados individualmente para cada localidade (Figura Suplementar 1). As amostras de Lar<sup>A</sup>, Lar<sup>M</sup>, Ale<sup>A</sup>, Ale<sup>B</sup>, Agr<sup>A</sup>, Agr<sup>M</sup>, SFr<sup>B</sup>, Bar<sup>B</sup> e Gde<sup>A</sup> apresentaram distribuição próxima a um padrão unimodal, já as amostras de Agr<sup>B</sup>, SFr<sup>A</sup>, SFr<sup>M</sup>, Bar<sup>A</sup>, Ara<sup>A</sup>, Ara<sup>M</sup>, Ara<sup>B</sup>, Gde<sup>M</sup> e Gde<sup>B</sup> apresentaram distribuição próxima a um padrão multimodal (Figura 3).



**Fig. 3** Representação da distribuição *mismatch* para os haplótipos mitocondriais obtidos para *Hypostomus ancistroides* em duas localidades amostradas. Os gráficos das outras localidades podem ser visualizados nos materiais suplementares.

### Estrutura Genética

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) indicou para os dados de microsatélite que a maior parte da variação genética está dentro de grupos (86,15%), porém valores significativos também foram obtidos entre grupos enquanto que para os dados das sequências mitocondriais a maior parte da variação foi encontrada entre grupos, indicando a existência de estruturação entre as subpopulações amostradas (Tabela 5).

Para ambos os marcadores o  $F_{ST}$  geral obtido foi significativo, indicando estruturação moderada para os dados de microssatélite (0,138) e estruturação muito alta para os dados de *D-loop* (0,553) (Tabela 5).

**Tabela 5** Análise da Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Hypostomus ancistroides* coletados em 21 localidades de um rio e ribeirões pertencentes à bacia do alto rio Paraná, no sul do Brasil. Valores significativos \* $P \leq 0,05$ .

Fonte da Variação	% de variação	
	<i>Microssatélite</i>	<i>D-loop</i>
Entre grupos	9,48%	51,47%
Entre populações dentro de grupos	4,37%	3,80%
Dentro de populações	86,15%	44,73%
Índice de Fixação	$\Phi_{ST}$ : 0,138*	$\Phi_{ST}$ : 0,553*
	$\Phi_{SC}$ : 0,048*	$\Phi_{SC}$ : 0,078*
	$\Phi_{CT}$ : 0,095*	$\Phi_{CT}$ : 0,515*

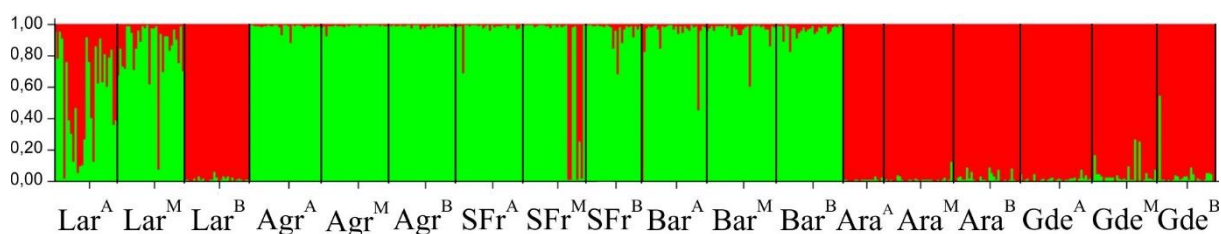
Na análise de diferenciação genética par a par ( $\Phi_{ST}$ ) para os dados de microssatélite das 18 amostras estudadas foi obtido 153 comparações, sendo que somente seis dessas comparações não apresentaram valores significativos ( $P \leq 0,05$ ), indicando níveis significativos de estruturação genética. A maior diferença significativa encontrada foi na comparação entre as amostras Lar<sup>B</sup> x Agr<sup>A</sup>, apresentando um  $\Phi_{ST} = 0,266$ . Os menores valores significativos foram de  $\Phi_{ST} = 0,013$  entre as amostras Agr<sup>M</sup> x Agr<sup>B</sup> e Ara<sup>A</sup> x Ara<sup>M</sup> (Tabela 6).

Da mesma maneira, para os dados os dados mitocondriais também foram encontrados níveis significativos de estruturação genética, onde das 210 comparações realizadas, 118 apresentaram estimativas de diferenciação genética ( $\Phi_{ST}$ ) significativas para a maioria das amostras envolvidas. Os maiores níveis de diferenciação foram obtidos para a amostra Gde<sup>A</sup>, a qual apresentou  $\Phi_{ST} = 1$  em relação a outras seis amostras (Ale<sup>A</sup>, Ale<sup>M</sup>, Ale<sup>B</sup> SFr<sup>A</sup>, SFr<sup>M</sup>, Bar<sup>M</sup> e Ara<sup>A</sup>). Enquanto isto, a menor diferença significativa foi de  $\Phi_{ST} = 0,079$  obtido entre as amostras Lar<sup>A</sup> x Bar<sup>B</sup> (Tabela 6).

**Tabela 6** Diferenciação genética par a par ( $\Phi_{ST}$ ) estimadas a partir de marcadores microssatélites e haplótipos mitocondriais, de amostras de *Hypostomus ancistroides*, referentes aos pontos de amostragens, distribuídos em um rio e seis ribeirões da bacia do alto rio Paraná, no sul do Brasil. Diagonal inferior -  $\Phi_{ST}$  par a par obtido a partir de dados de microssatélites. Diagonal superior -  $\Phi_{ST}$  par a par obtido a partir de dados de DNAm (*D-Loop*). Valores significativos \* $P \leq 0,05$  (teste de significância usando 1023 permutações).

	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>B</sup>	Ale <sup>A</sup>	Ale <sup>M</sup>	Ale <sup>B</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>B</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>B</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>B</sup>	Ara <sup>A</sup>	Ara <sup>M</sup>	Ara <sup>B</sup>	Gde <sup>A</sup>	Gde <sup>M</sup>	Gde <sup>B</sup>
Lar <sup>A</sup>		0,082*	-0,033	-0,036	-0,002	-0,131	-0,366	-0,367	0,200*	-0,199	-0,136	-0,057	0,046	-0,002	0,079*	-0,581	0,136*	0,382*	0,885*	0,763*	0,609*
Lar <sup>M</sup>	0,061*		-0,161	0,156*	0,184*	0,061	-2,187	-1,479	-0,427	0,020	0,054	0,086*	-0,023	0,184*	-0,028	-0,372	0,043	0,303*	0,803*	0,685*	0,503*
Lar <sup>B</sup>	0,195*	0,156*		0,567*	0,582*	0,503*	0,094	-0,091	0,326*	0,500*	0,495*	0,276*	-0,174	0,582*	-0,111	0,207	-0,054	0,007	0,887*	0,617*	0,365*
Ale <sup>A</sup>	-	-			0	0	0,931*	0,892*	0,822*	0	0	0,063	0,130*	0	0,144*	0	0,550*	0,608*	1*	0,891*	0,806*
Ale <sup>M</sup>	-	-	-			0	0,933*	0,895*	0,828*	0	0	0,097	0,159*	0	0,172*	0	0,565*	0,621*	1*	0,895*	0,812*
Ale <sup>B</sup>	-	-	-	-	-		0,918*	0,871*	0,789*	0	0	-0,042	0,033	0	0,049	0	0,480*	0,545*	1*	0,870*	0,769*
Agr <sup>A</sup>	0,163*	0,118*	0,266*	-	-	-		0,128	-0,177	0,920*	0,916*	0,412*	-1,853	0,933*	-1,857	0,855*	-0,166	-0,394	0,973*	0,471*	0,097
Agr <sup>M</sup>	0,152*	0,094*	0,249*	-	-	-	0,004		-0,042	0,875*	0,868*	0,368*	-1,357	0,895*	-1,245	0,773*	-0,421	-0,785	0,939*	0,220	-0,292
Agr <sup>B</sup>	0,160*	0,110*	0,257*	-	-	-	0,003	0,013*		0,793*	0,785*	0,544*	-0,382	0,828*	-0,261	0,636*	0,250*	0,179*	0,926*	0,654*	0,442*
SFr <sup>A</sup>	0,107*	0,053*	0,198*	-	-	-	0,127*	0,120*	0,110*		0	-0,102	-0,012	0	0,007	0	0,476*	0,545*	1*	0,873*	0,774*
SFr <sup>M</sup>	0,150*	0,091*	0,201*	-	-	-	0,136*	0,121*	0,125*	0,058*		-0,048	0,026	0	0,042	0	0,471*	0,538*	1*	0,867*	0,764*
SFr <sup>B</sup>	0,123*	0,040*	0,205*	-	-	-	0,109*	0,093*	0,090*	0,049*	0,059*		0,044	0,097	0,089	-0,539	0,341*	0,488*	0,958*	0,831*	0,709*
Bar <sup>A</sup>	0,080*	0,014*	0,156*	-	-	-	0,089*	0,070*	0,085*	0,041*	0,071*	0,021*		0,159*	-0,009	-0,413	0,034	0,297*	0,813*	0,690*	0,508*
Bar <sup>M</sup>	0,092*	0,015*	0,183*	-	-	-	0,104*	0,083*	0,095*	0,042*	0,071*	0,018*	0,003		0,172*	0	0,565*	0,621*	1*	0,895*	0,812*
Bar <sup>B</sup>	0,095*	0,028*	0,205*	-	-	-	0,105*	0,083*	0,101*	0,052*	0,089*	0,022*	0,002	-0,002		-0,386	0,084	0,339*	0,827*	0,712*	0,540*
Ara <sup>A</sup>	0,190*	0,147*	0,058*	-	-	-	0,262*	0,246*	0,258*	0,201*	0,217*	0,212*	0,157*	0,182*	0,200*		0,158	0,260*	1*	0,770*	0,597*
Ara <sup>M</sup>	0,150*	0,117*	0,050*	-	-	-	0,238*	0,220*	0,233*	0,170*	0,181*	0,182*	0,127*	0,144*	0,164*	0,013*		0,019	0,835*	0,566*	0,310*
Ara <sup>B</sup>	0,135*	0,098*	0,039*	-	-	-	0,214*	0,194*	0,204*	0,152*	0,162*	0,163*	0,110*	0,128*	0,149*	0,025*	0,006		0,640*	0,354*	0,091
Gde <sup>A</sup>	0,200*	0,167*	0,136*	-	-	-	0,230*	0,223*	0,224*	0,212*	0,233*	0,230*	0,175*	0,195*	0,210*	0,131*	0,116*	0,096*		0,119	0,461*
Gde <sup>M</sup>	0,143*	0,105*	0,077*	-	-	-	0,181*	0,168*	0,172*	0,148*	0,157*	0,154*	0,108*	0,126*	0,143*	0,056*	0,044*	0,026*	0,069*		0,092
Gde <sup>B</sup>	0,140*	0,116*	0,044*	-	-	-	0,202*	0,187*	0,195*	0,150*	0,156*	0,161*	0,114*	0,135*	0,148*	0,053*	0,033*	0,026*	0,068*	0,016*	

Para os marcadores microssatélites a análise de agrupamentos Bayesianos apontou um  $K$  (número de grupamentos) mais provável igual a dois ( $K=2$ ), sendo que para tal análise foi considerando cada localidade amostrada como uma subpopulação. O gráfico resultante mostra a formação de dois grandes grupos, que agrupou as amostras da porção baixa do rio Laranjinha e dos ribeirões Araras e Grande ( $Ara^A$ ,  $Ara^M$ ,  $Ara^B$ ,  $Gde^A$ ,  $Gde^M$  e  $Gde^B$ , que de fato, são os ribeirões mais próximos da foz do rio, enquanto o outro agrupamento abrangeu a porção média do rio Laranjinha ( $Lar^M$ ) e os ribeirões Água Grande, São Francisco e Barreiro ( $Agr^A$ ,  $Agr^M$ ,  $Agr^B$ ,  $Bar^A$ ,  $Bar^M$  e  $Bar^B$ ). Apenas a amostra referente a porção alta do rio Laranjinha ( $Lar^A$ ) apresentou uma distribuição mais homogênea das ancestralidades (Figura 4).



**Figura 4** Representação gráfica obtidas de  $K=2$  gerado a partir de 9 locos microssatélites para as amostras de *Hypostomus ancistroides* coletados em 18 localidades da bacia do rio Laranjinha, alto rio Paraná, no sul do Brasil.

### *Fluxo Gênico*

As estimativas de fluxo gênico recente realizada por meio de análise Bayesiana indicou uma alta porcentagem de não migrantes nos pontos amostrados, variando de 78% ( $SFr^B$ ,  $Bar^A$ ,  $Bar^M$ ,  $Ara^A$  e  $Ara^M$ ) a 83% ( $Ara^B$ ). Enquanto a porcentagem de migrantes não passou de 2% em todas as amostras estudadas (Tabela Suplementar 1).

## Discussão

Tanto os dados de DNA nuclear (microsatélites) quanto os de DNAm<sub>t</sub> mostraram que a diversidade genética de *H. ancistroides* encontra-se heterogeneamente distribuída ao longo da bacia do rio Laranjinha. Padrões de estrutura genética em curtas distâncias geográficas foram evidenciados para grande parte dos ribeirões analisados. Além disto, os dados mostraram que existem parcelas particulares de diversidade genética da espécie que são mantidas entre as diferentes drenagens estudadas. De modo geral, os padrões obtidos mostram relações com as estruturas dos ambientes, processos de colonização da bacia e deslocamento limitado da espécie.

### *Estrutura genética em fina escala*

Níveis significativos de estrutura genética foram obtidos entre quase todas as amostras estudadas no presente estudo. Esta diferenciação ocorreu mesmo entre amostras do mesmo ribeirão, separadas por curtas distâncias geográficas. Isto foi evidenciado pelos valores significativos dos índices de diferenciação par a par ( $\Phi_{ST}$ ), principalmente para locos microsatélites, pelas análises de agrupamento Bayesianas e pela estimativa Bayesiana de fluxos gênico. Interessantemente, estes resultados corroboram os padrões previamente obtidos para subpopulações desta espécie (Sofia *et al.*, 2008) e de outras espécies de peixes em ribeirões neotropicais (Leuzzi *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2016) e não neotropicais (Carlsson *et al.*, 1999; Carlsson & Nilsson 2000; Lamphere & Blum, 2012), os quais sugeriram a possibilidade de diferenciação genética em curtas distâncias geográficas dentro destas pequenas drenagens.

Comparado as distâncias entre os pontos amostrais do rio (166,87 km a 348,87 km), as amostras analisadas dentro dos ribeirões são separadas por distâncias geográficas bem menores, variando de 8,9 a 27,2 km entre pontos. Interessantemente, apesar de algumas amostras com estrutura genética significativa para microsatélites serem separadas por mais de 20 km, SFr<sup>A</sup> x SFr<sup>B</sup> e Gde<sup>A</sup> x Gde<sup>B</sup>, todas as demais diferenciações significativas, obtidas nos ribeirões Araras (Ara<sup>A</sup> x Ara<sup>M</sup> e Ara<sup>A</sup> x Ara<sup>B</sup>), Água Grande (Agr<sup>M</sup> x Agr<sup>B</sup>), São Francisco (SFr<sup>A</sup> x SFr<sup>M</sup> e SFr<sup>M</sup> x SFr<sup>B</sup>) e Grande (Gde<sup>A</sup> x Gde<sup>M</sup> e Gde<sup>M</sup> x Gde<sup>B</sup>), ocorreram entre pontos amostrais separados por menos de 15 km. O DNAm<sub>t</sub> também mostrou diferenciações significativas entre amostras dos ribeirões Barreiro (Bar<sup>A</sup> x Bar<sup>M</sup> e Bar<sup>M</sup> x Bar<sup>B</sup>) e Grande (Gde<sup>A</sup> x Gde<sup>B</sup>), com distâncias geográficas variando de 17,6 a 27,2 km. Contudo, o DNAm<sub>t</sub> pode muitas vezes não detectar alterações populacionais mais recentes tão eficientemente como os estudos de DNA nuclear (Mccusker & Bentzen, 2010), o que

explicaria o DNAMt não ter mostrado os mesmos padrões de estrutura genética em fina escala obtidos para os dados de microssatélites.

Considerando esta diferença entre os resultados nucleares e o DNAMt, os dados sugerem que os padrões de diferenciação refletem de processos atuais, incluindo influências das características dos ambientes e da biologia da espécie. Segundo Winemiller *et al.* (2008), ribeirões podem apresentar variações espaciais e temporais que influenciam no modo de distribuição das populações de peixes ao longo do fluxo. Estas variações incluem, por exemplo, a presença de barreiras, tais como cachoeiras, as quais podem fornecer obstáculos para o deslocamento. Isto foi evidenciado, por exemplo, no ribeirão São Francisco, onde existe uma cachoeira de mais de cinco metros entre as porções alta e média. Além disso, outras características de ribeirões também podem influenciar na distribuição genética de uma espécie, tais como a altitude, precipitação, temperatura, cobertura florestal, química da água (Reis *et al.*, 2016), a constituição dendrítica da bacia (Hughes *et al.*, 2009) e de modo negativo, há também a interferência antrópica sobre os ribeirões, os quais são altamente sensíveis a esse tipo de alteração (Luiz *et al.*, 1998).

Ao mesmo tempo, os dados do presente estudo, principalmente os índices de diferenciação e a análise Bayesiana de fluxo gênico, também sugerem influências de um deslocamento limitado, possivelmente relacionado a biologia da espécie. Estudos prévios já haviam sugerido deslocamento limitado para essa espécie (Zawadzki *et al.*, 2005; Sofia *et al.*, 2008). Contudo, o presente estudo é um dos primeiros a mostrar informações mais precisas (estatisticamente) para tal característica em *H. ancistroides*.

De fato, alguns estudos sobre o gênero *Hypostomus* destacam que a maioria das espécies que compõe este grupo é formado por espécies que não realizam movimentos migratórios, incluindo espécies com cuidado parental (Agostinho *et al.*, 2007). Contudo, informações sugerindo uma mobilidade limitada para *Hypostomus ancistroides* ao longo das drenagens foram obtidas apenas indiretamente, a partir de resultados de estruturação genética ou considerando as características do grupo (Sofia *et al.*, 2008; Galindo, 2014). O presente estudo, além de mostrar diferenças populacionais em curtas distâncias geográficas, destaca a ocorrência de estimativas muito baixas (Bayesianas) de fluxo gênico entre os trechos analisados, inclusive dentro dos mesmos ribeirões. Isto também foi corroborado pela análise de DNAMt, a qual mostrou alguns haplótipos limitados a apenas um dos pontos dos ribeirões, o que não seria esperado se o deslocamento não fosse limitado.

### *Padrões filogeográficos*

Ao mesmo tempo, as informações obtidas a partir do DNAm<sub>t</sub> também sugerem que a distribuição da variação mitocondrial de *H. ancistroides* poderia ser reflexo do processo de colonização recente (evolutivamente) desta espécie na bacia. A maior parte das amostras estudadas apresentaram  $h < 0,5$  e  $\pi < 0,5\%$ , o que, segundo Grant & Bowen (1998), indica gargalo genético ou efeito fundador por uma única ou poucas linhagens mitocondriais. Além disto, o restante das amostras apresentou  $h > 0,5$  e  $\pi < 0,5\%$ , o que indica gargalo seguido de um rápido crescimento populacional e acúmulo de mutações (Grant & Bowen, 1998). Interessantemente, estes dois padrões concordam que processo de dispersão da espécie ao longo da bacia influenciou a distribuição da diversidade mitocondrial da espécie, possivelmente como consequência do efeito fundador durante um processo de colonização historicamente recente. Padrões similares, sugerindo gargalos genéticos e expansões populacionais para *H. ancistroides* também foram obtidos por Hollanda Carvalho *et al.* (2016) em outros rios da bacia do alto rio Paraná.

No geral, os padrões obtidos para a distribuição *mismatch* de cada ribeirão também reforçam a hipótese destacada acima. A maior parte das amostras apresentou padrões de distribuição unimodais para esta análise, o que comumente indica processos de expansão populacional (Rogers & Harpending, 1992). Isto também é corroborado pelos valores significativos e negativos obtidos para algumas amostras nos testes de Fu e Tajima, uma vez que valores significativos e negativos para estas análises são comumente relacionados a processos de expansões populacionais recentes (Excoffier *et al.*, 2005; Cunha & Solé-Cava 2012; Holsinger, 2012). Os dados sugerem que esta colonização foi iniciada a partir da foz do rio Laranjinha, de modo que a espécie ocupou drenagens dos trechos baixos da bacia em períodos anteriores a dispersão para drenagens da porção alta. Corroborando isto, as estimativas de diversidade ( $Nh$ ,  $h$  e  $\pi$ ) foram maiores para ribeirões da seção baixa da bacia, enquanto que algumas amostras da seção média e alta apresentaram apenas um haplótipo. Além disto, padrões unimodais na distribuição *mismatch* foram mais comuns entre as amostras de trechos superiores, enquanto as drenagens do trecho baixo mostraram distribuições multimodais, sugerindo que subpopulações em ribeirões mais próximos à foz do rio estão estabelecidas a mais tempo que aquelas em ribeirões da seção alta da bacia.

Ainda neste contexto, tanto os dados de DNAm<sub>t</sub> quanto os de microssatélites mostram uma tendência de aumento dos níveis de diversidade genética no sentido nascente-foz, tanto ao longo dos ribeirões quanto ao longo do rio, ou mesmo com relação aos ribeirões em cada seção do rio. Interessantemente, diferentes estudos discutem sobre a tendência do aumento da

diversidade de espécies no sentido cabeceira-foz em drenagens de água doce, obedecendo o conceito de Rio Contínuo (Vannote *et al.*, 1980). Em termos de distribuição da diversidade genética intra-específica, alguns autores também apresentam dados que concordam com este padrão, incluindo estudos de invertebrados aquáticos (Zickovich & Bohonak, 2007; Alp *et al.*, 2012) e de peixes, tanto em drenagens neotropicais (Sofia *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2015) quanto em outras partes do planeta (Lamphere & Blum, 2011; Junker *et al.*, 2012; Kelson *et al.*, 2015). De fato, ribeirões geralmente sofrem mudanças graduais nas características de seu fluxo em direção a jusante, mostrando meso-habitats maiores, maior número de espécies, menor número de barreiras para o deslocamento nos trechos baixos, e habitats mais estáveis (Winemiller *et al.*, 2008). Deste modo, embora mais estudos sejam necessários, aumentos dos níveis de diversidade em direção a jusante poderiam ser um padrão para estas drenagens, principalmente quando se considera a possibilidade de maiores tamanhos efetivos populacionais em trechos a jusante.

#### *Diversidade genética particular*

Diferentes análises, incluindo as estimativas de diversidade genética (DNAmt e microssatélites), rede de haplótipos e os níveis de diferenciação genética, indicaram uma distribuição heterogênea para a diversidade genética de *H. ancistroides* ao longo da bacia do rio Laranjinha, destacando parcelas particulares de diversidade genética em cada um dos ribeirões estudados. Resultados similares foram previamente reportados para outras espécies em sistemas hídricos da região Neotropical (Ferreira *et al.*, 2015) e de outras partes do planeta (Carlsson *et al.*, 1999; Adamson *et al.*, 2012; Kelson *et al.*, 2015). No mesmo sistema hidrográfico do presente estudo, Ferreira *et al.* (2015) analisaram uma espécie também considerada de deslocamento limitado e obtiveram diferenças significativas entre um ribeirão e a calha principal da bacia. Na América do Norte, Kelson *et al.* (2015) obtiveram diferenciação significativa entre amostras de ribeirões da bacia do rio Diamond e entre sua calha principal. Na bacia do rio Mekong (sudoeste asiático), Adamson *et al.* (2012) evidenciou parcelas particulares de diversidade genética em um dos tributários e altos valores de diferenciação entre amostras de uma espécie de peixe não migradora. Na Europa (Suécia), amostras de *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758) de um afluente do rio Nordre Finnavikelv apresentaram altos valores de  $\Phi_{ST}$  contra todas as amostragens do rio (Carlsson *et al.*, 1999).

Os dados mitocondriais revelaram 11 haplótipos que ocorrem somente em ribeirões e, entre estes, seis foram haplótipos exclusivos em cada uma das respectivas drenagens,  $Ale = 2$ ,  $Gde = 2$ ,  $Bar = 1$  e  $SFr = 1$ . Notavelmente, a maior parte dos haplótipos exclusivos apresentou

poucos passos mutacionais (1 a 5) em relação ao haplótipo principal, sugerindo que estes foram originados dentro de seus respectivos ribeirões de ocorrência e ainda não se distribuíram para outras drenagens, possivelmente em virtude do deslocamento limitado da espécie (Zawadzki *et al.*, 2005; Sofia *et al.*, 2008). Corroborando os dados de DNAmT, alelos microssatélites privados fora obtidos para quatro dos cinco ribeirões analisados, SFr = 15, Bar = 5, Ara = 8 e Gde = 8. Similarmente, Ferreira *et al.* (2015) analisou subpopulações de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), espécie não migradora e com cuidado parental, ao longo da mesma bacia do presente estudo e também encontrou um haplótipo mitocondrial e alelos microssatélites restrito a um ribeirão, os quais não foram obtidos em nenhum dos outros cinco trechos amostrados ao longo da calha principal do rio Laranjinha.

Outra evidência marcante para a presença de parcelas particulares de diversidade genética em cada ribeirão foi fornecida pelas estimativas de diferenciação genética para ambos os marcadores estudados. Comparando os ribeirões entre si e com o rio, os dados mostraram uma distribuição heterogênea da diversidade genética, de modo que a maior parte dos ribeirões parece representar uma unidade genética diferente. Apesar da possível conectividade entre alguns destes ribeirões, parece plausível que após a colonização de cada uma destas drenagens, pouco fluxo gênico tenha ocorrido entre elas, contribuindo para a diferenciação populacional. De fato, o comportamento não migratório descrito para o gênero *Hypostomus* (Agostinho *et al.*, 2007), parece ser favorável para que ocorra estruturação genética. Sofia *et al.* (2008), por exemplo, aplicaram marcadores RAPDs em subpopulações desta espécie e mostraram níveis moderados de diferenciação populacional ocorrendo em menos de 7 km ao longo de um ribeirão urbano. De modo similar, esta tendência de diferenciação também é comumente reportada para outras espécies do mesmo gênero (Zawadzki *et al.*, 2004, 2008; Borba *et al.*, 2013). Interessantemente, o estudo de Ferreira *et al.* (2015) com uma espécie também não migradora (*Geophagus brasiliensis*) encontrou resultados similares ao do presente estudo.

A distribuição heterogênea da diversidade genética de *H. ancistroides* e os altos níveis de estruturação entre as drenagens da bacia do rio Laranjinha corroboram um padrão de distribuição de acordo com o modelo *Hierarchical Streams*, onde em redes dendríticas, tais como a do presente estudo, é esperado que os níveis de diferenciação entre as diferentes drenagens de uma bacia sejam maiores que aqueles entre amostras ao longo de uma mesma drenagem (Meffe & Vrijenhoek, 1998). De fato, dentro de uma mesma drenagem, mesmo para espécies não migradoras, o fluxo de genes poderia ocorrer aos passos, seguindo algo próximo ao modelo Passo a Passo de dispersão, onde trocas alélicas entre grupos próximos

permitem a distribuição de novas variantes ao longo das gerações (Kimura & Weiss, 1964). Adicionalmente, como evidenciado no presente estudo, *H. ancistroides* é uma espécie de deslocamento limitado, fato que a torna propensa a desenvolver algum grau de divergência genética quando comparadas subpopulações da mesma espécie (Endo *et al.*, 2012). Deste modo, é importante considerar que ambos os fatores, características de conectividade da bacia e biologia da espécie, podem ter contribuições importantes para os padrões aqui obtidos.

De modo particular, as informações aqui obtidas demonstram grande importância para a compreensão de aspectos evolutivos relacionados a ribeirões, bem como para a preservação destas drenagens. Como é de conhecimento, ribeirões neotropicais apresentam um conjunto de características particulares a eles, incluindo habitats e microhabitats únicos e uma ictiofauna, na grande maioria das vezes, diferente das encontradas em grandes drenagens (Castro, 1999; Castro *et al.*, 2003). As diferenças genéticas encontradas no presente estudo, além de estarem de acordo com a biologia da espécie estudada, também corroboram informações que atribuem elevado grau endemismo a drenagens de pequeno porte, incluindo os ribeirões (Castro, 1999). Em contrapartida, as mesmas características que tornam essas drenagens tão únicas (por exemplo, seus menores volumes de água e ictiofauna de pequeno porte), podem ser também constituir um fator de maior debilidade de tais drenagens, no sentido de que as tornam mais sensíveis a alterações ambientais (Luiz *et al.*, 1998). Assim, se estas drenagens sofrerem impactos, sua recuperação pode não ser efetiva e parcelas importantes da diversidade genética das espécies ao longo das bacias podem ser perdidas permanentemente (Castro, 1999; Agostinho *et al.*, 2005).

De modo geral, os níveis de diversidade aqui obtidos para *H. ancistroides* são similares aos previamente reportados para esta espécie (Galindo, 2014). Para os dados de microsatélite bons níveis de diversidade genética foram encontrados em todas subpopulações amostradas ( $\bar{H}_O = 0,644$ ). Por outro lado, os níveis de diversidade encontrados para os dados de DNAm se mostraram baixos para a maioria das amostras estudadas, porém foram condizentes com valores encontrados para a mesma espécie amostrada na mesma bacia por Galindo (2014), da mesma maneira Zawadzki *et al.* (2005) utilizando marcadores aloenzimáticos, também encontrou baixos níveis de diversidade genética tanto para *H. ancistroides* ( $H_e$ : 0,059) quanto para outros *Hypostomus* analisados ( $H_e$ : 0,018 a 0,086), utilizando o mesmo método, Paiva *et al.* (2005) obtiveram uma diversidade variando de 0 a 0,028, para espécies deste gênero. Levando esses trabalhos em consideração, pode-se sugerir que níveis não tão altos de diversidade genética mitocondrial podem ser indicações de eventos de efeito fundador em subpopulações de *H. ancistroides* amostrados em uma mesma

drenagem.

Em termos de conservação genética das espécies, esforços comumente buscam conservar o máximo de variação existente dentro e entre subpopulações de uma espécie (Hisdorf *et al.*, 2006; Frankham *et al.*, 2010). Deste modo, a distribuição heterogênea da diversidade genética de *H. ancistroides* obtida para as drenagens da bacia do rio Laranjinha destaca que qualquer medida de preservação que vise a manutenção da diversidade genética de espécies amplamente distribuídas deve considerar tanto os rios como os seus ribeirões. Como foi observado no presente estudo, a degradação de qualquer uma das drenagens estudadas poderia culminar na perda de parcelas exclusivas da diversidade genética geral. Assim, o presente estudo constitui mais uma evidência de que a preservação exclusiva de grandes drenagens não é suficiente para a preservação da ictiofauna de água doce da região Neotropical. Contudo, tem sido cada vez mais alarmante a situação das pequenas drenagens desta região. Na bacia do rio Laranjinha, por exemplo, são nítidas as diferentes formas de interferência antrópica sobre ribeirões, incluindo poluição, desmatamento, assoreamento e pequenos barramentos, principalmente em trechos próximos a regiões urbanas. Infelizmente, nos dias de hoje, pouca atenção é dada a estas pequenas drenagens não fazendo jus a sua riqueza, tanto ecológica quanto genética. O mesmo pode ser dito em relação a espécie em estudo, *Hypostomus ancistroides*, que apesar de ser extremamente abundante e não possuir valor comercial significativo, possui grande importância biológica (Angelescu & Gneri, 1949). Além disto, apesar do enfoque desse estudo ter sido esta espécie, uma efetiva conservação e preservação de ribeirões iria beneficiar todos os tipos de organismo que estão ali presentes.

É importante destacar também que tantas particularidades restritas a ribeirões, tais como essas evidenciadas em nosso estudo, impossibilitam que medidas desenvolvidas para drenagens de maior porte sejam aplicadas em pequenas drenagens, portanto medidas específicas devem ser criadas, para que a proteção dos ribeirões e toda a sua biologia seja efetiva.

## Conclusões

Foi encontrada diferenciação genética em pequena escala para a maioria das amostras dos ribeirões, principalmente para os dados de microssatélite. Além disso, os valores de diferenciação encontradas dentro e entre as drenagens, indicando a presença de subpopulações distintas, sugere a presença de parcelas particulares de diversidade genética para os ribeirões. Adicionalmente as taxas de migração entre as subpopulações foram muito baixas, corroborando com os níveis de estruturação genética encontrada.

A diversidade genética encontrada para as amostras de *H. ancistroides* se mostrou de acordo com resultados reportados para outras espécies de peixe da região Neotropical com o mesmo comportamento não migratório. Os índices de diversidade indicaram expansão populacional recente, posterior a algum evento de redução, possivelmente relacionado ao processo de colonização da bacia.

O presente estudos também ressalta a importância de associar marcadores moleculares diferentes para que os resultados se aproximem o máximo da realidade.

Os dados obtidos deixaram claro que a diversidade genética de *H. ancistroides* se encontra distribuída de modo heterogêneo dentro da bacia e que cada ribeirão pode abrigar parcelas particulares da diversidade genética total.

Essas informações trazem grandes contribuições para o entendimento de aspectos evolutivos envolvendo tanto *H. ancistroides* quanto outras espécies que habitam ribeirões, além disso, são essenciais para a conservação, pois mostram que medidas voltadas apenas para grandes drenagens não são suficientes para a preservação de toda a diversidade de peixes de água doce.

## Agradecimentos

Os autores são profundamente gratos a Fundação Araucária, pelo suporte financeiro; a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos atribuída a C. Apolinário-Silva; ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) / ICMBio (Instituto Chico Mendes- MMA) pela licença de coleta de amostras. Silvia H. Sofia é um pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referências

- Adamson, E. A., Hurwood, D. A., & Mather, P. B. (2012). Insights into historical drainage evolution based on the phylogeography of the chevron snakehead fish (*Channa striata*) in the Mekong Basin. *Freshwater Biology*, **57**, 2211-2229.
- Agostinho, A. A., Pelicice, F. M., Petry, A. C., Gomes, L. C., & 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.
- Agostinho, Â. A., Thomaz, S. M., & Gomes, L. C. (2005). Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, **1**, 70-78.
- Akaike, H. (1998). Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: *Selected Papers of Hirotugu Akaike*, pp. 199-213, Springer, New York.
- Allan, J. D., & Flecker, A. S. (1993). Biodiversity conservation in running waters. *BioScience*, **43**, 32-43.
- Almeida, F. S., Fungaro, M. H. P., & Sodr e, L. M. K. (2001). RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. *Journal of Zoology*, **253**, 113-120.
- Alp, M., Keller, I., WESTRAM, A., & Robinson, C. T. (2012). How river structure and biological traits influence gene flow: a population genetic study of two stream invertebrates with differing dispersal abilities. *Freshwater Biology*, **57**, 969-981.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, **215**, 403-410.
- Angelescu, V., & Gneri, F. S. (1949). *Adaptaciones del aparato digestivo al régimen alimenticio en algunos peces del Río Uruguay y del Río de la Plata: I. tipo omnívoro e ili fago en representantes de las familias "Loricariidae" y "Anostomidae"*. Casa Ed. "Coni".
- Balian, E. V., Segers, H., L v que, C., & Martens, K. (2008). The freshwater animal diversity assessment: an overview of the results. *Hydrobiologia*, **595**, 627-637.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & R hl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, **16**, 37-48.
- Borba, R. S. D., Zawadzki, C. H., Oliveira, C., Perdices, A., Parise-Maltempi, P. P., & Alves, A. L. (2013). Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. *Neotropical Ichthyology*, **11**, 111-116.
- Blum, M. J., Bagley, M. J., Walters, D. M., Jackson, S. A., Daniel, F. B., Chaloud, D. J., & Cade, B. S. (2012). Genetic diversity and species diversity of stream fishes covary across a land-use gradient. *Oecologia*, **168**, 83-95.

- Cardoso, Y. P., Brancolini, F., Protogino, L., & Lizarralde, M. (2011). Actinopterygii, Siluriformes, Loricariidae, *Hypostomus aspilogaster* (Cope, 1894). Distribution extension and first record for Argentina. *Check List*, **7**, 596-598.
- Carlsson, J., Olsen, K. H., Nilsson, J., Øverli, Ø. & Stabell, O. B. (1999). Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in stream-living brown trout. *Journal of Fish Biology*, **55**, 1290-1303.
- Carlsson, J., & Nilsson, J. (2000). Population genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) within a northern boreal forest stream. *Hereditas*, **132**, 173-181.
- Casatti, L. (2005). Fish assemblage structure in a first order stream, southeastern Brazil: longitudinal distribution, seasonality, and microhabitat diversity. *Biota Neotropica*, **5**, 75-83.
- Castro, R. M. C. (1999). Evolução da ictiofauna de rios sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: *Ecologia de Peixes de Riachos, Série Oecologia Brasiliensis*, pp. 139-155, Rio de Janeiro.
- Castro, R. M. C., Casatti, L., Santos, H. F., Ferreira, K. M., Ribeiro, A. C., Benine, R. C., Dardis, G. Z. P., Melo, A. L. A., Abreu, T. X., & Bockmann, F. A., Carvalho, M., Gibran, & F. Z., Lima, F. C. T. (2003). Estrutura e composição da ictiofauna de ribeirões do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. *Biota Neotropica*, **3**, 1-31.
- Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- Costa, A. D. A., Ferreira, D. G., da Silva, W. F., Zanatta, A. S., Shibatta, O. A., & Galindo, B. A. (2013). Fishes (Osteichthyes: Actinopterygii) from the Penacho stream, upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. *Check List*, **9**(3), 519-523.
- Cunha, H.A., & Solé-Cava, A.M. (2012). Análise filogeográfica. In: *Biologia Molecular e Evolução* (Ed. Matioli, S.R., & Fernandes, F.M.C), pp. 197-2015. Holos Editora. pp., Ribeirão Preto.
- Cunico, A. M., da Graça, W. J., Agostinho, A. A., Domingues, W. M., & Latini, J. D. (2009). Fish, Maringá urban streams, Pirapó river drainage, upper Paraná river basin, Paraná State, Brazil. *Check List*, **5**, 273-280.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, **9**, 772-772.
- Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, **4**, 359-361.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, **32**, 1792-1797.

- Endo, K. S., Martinez, E. R. M., Zawadzki, C. H., de Souza Paiva, L. R., & Júnior, H. F. J. (2011). Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae-[doi: 10.4025/actasciobiolsci.v34i2.9318](https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v34i2.9318). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, **34**, 181-189.
- Eschmeyer, W. N., Fricke, R., & Van der Laan, R. (2017). Catalog of fishes: genera, species, references. Disponível em <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>, acesso em 1 fevereiro 2017.
- Esteves, K. E., Aranha, J. M. R., Caramaschi, E. P., Mazzoni, R., & Peres-Neto, P. R. (1999). In: *Ecologia trófica de peixes de riachos*. Ecologia de peixes de riachos. *Série Oecologia Brasiliensis*, pp. 157-182.
- 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.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Excoffier, L. G.; Laval, A.; Scheneider, S. (2005). Arlequin ver 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Ferreira, D. G., Galindo, B. A., Alves, A. N., Almeida, F. S., Ruas, C. F., & Sofia, S. H. (2013). Development and characterization of 14 microsatellite loci in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). *Journal of fish biology*, **83**, 1430-1438.
- Ferreira, D. G., Galindo, B. A., Frantine-Silva, W., Almeida, F. S., & Sofia, S. H. (2015). Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. *Conservation genetics*, **16**, 151-166.
- Ferreira, D. G., Lima, S. C., Frantine-Silva, W., Silva, J. F., Apolinário-Silva, C., Sofia, S. H., ... & Galindo, B. A. (2016). Fine-scale genetic structure patterns in two freshwater fish species, *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes, Cichlidae) and *Astyanax altiparanae* (Osteichthyes, Characidae) throughout a Neotropical stream. *Genetics and molecular research: GMR*, **15**.
- Ferreira, D. G., Souza-Shibatta, L., Shibatta, O. A., Sofia, S. H., Carlsson, J., Dias, J. H. P., & Makrakis, M. C. (2016). Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1-23.
- Frankham, R., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Galindo B.A. (2014). *Diversidade de peixes do Rio Laranjinha – Alto Rio Paraná*. Ph.D. Thesis in Genetics and Molecular Biology. State University of Londrina, Londrina.

- Galindo, B. A., Ferreira, D. G., Almeida, F. S., Carlsson, J., & Sofia, S. H. (2015). Isolation and characterization of 13 polymorphic microsatellite loci in *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) and cross-amplification in related species. *Journal of fish biology*, **86**, 1860-1866.
- Garcez, R., Calcagnotto, D., Almeida-Toledo, D., & Foresti, L. (2011). Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from Rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **21**, 268-275.
- Geist, J. (2011). Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. *Ecological Indicators*, **11**, 1507-1516.
- Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Graça, W. J., & Pavanelli, C. S. (2007). Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes.
- Grant W.S. & Bowen B.W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines e anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, **89**, 415-426.
- Heithaus, M. R., & Laushman, R. H. (1997). Genetic variation and conservation of stream fishes: influence of ecology, life history, and water quality. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**, 1822-1836.
- Hilsdorf, A. W. S., de Resende, E. K., & Marques, D. K. S. (2006). Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas. *Embrapa Pantanal. Documento*.
- Hollanda Carvalho, P., Maia Queiroz Lima, S., Henrique Zawadzki, C., Oliveira, C., & de Pinna, M. (2016). Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region. *Mitochondrial DNA Part A*, **27**, 3590-3596.
- Holsinger, K. E. (2006). Lecture notes in population genetics. *Storrs—Mansfield: Dept. Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut*.
- Hughes, J. M., Schmidt, D. J., & Finn, D. S. (2009). Genes in streams: using DNA to understand the movement of freshwater fauna and their riverine habitat. *BioScience*, **59**, 573-583.
- Junker, J., Peter, A., Wagner, C. E., Mwaiko, S., Germann, B., Seehausen, O., & Keller, I. (2012). River fragmentation increases localized population genetic structure and enhances asymmetry of dispersal in bullhead (*Cottus gobio*). *Conservation Genetics*, **13**, 545-556.

- Kelson, S. J., Kapuscinski, A. R., Timmins, D., & Ardren, W. R. (2015). Fine-scale genetic structure of brook trout in a dendritic stream network. *Conservation genetics*, **16**, 31-42.
- Kimura, M., & Weiss, G. H. (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, **49**, 561.
- Lamphere, B. A., & Blum, M. J. (2012). Genetic estimates of population structure and dispersal in a benthic stream fish. *Ecology of Freshwater Fish*, **21**, 75-86.
- Leuzzi, M. S. P., Almeida, F. S. D., Orsi, M. L., & Sodr e, L. M. K. (2004). Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **27**, 355-362.
- Lev eque, C., Oberdorff, T., Paugy, D., Stiassny, M. L. J., & Tedesco, P. A. (2008). Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 545-567.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Lowe-McConnell, R. H. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. In: *Cole o Base*. Edusp.
- Lucena, C. A. S., Calegari, B. B., Pereira, E. H. L., & Dallegrave, E. (2013). O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia*, **105**, 20-24.
- Luikart G. & Cornuet J.M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, **12**, 228-237.
- Luiz, E. A., Agostinho, A. A., Gomes, L. C., & Hahn, N. S. (1998). Ecologia trófica de peixes em dois riachos da bacia do rio Paraná. *Revista Brasileira de Biologia*, **58**, 273-285.
- McCusker, M. R., & Bentzen, P. (2010). Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes. *Molecular Ecology*, **19**, 4852-4862.
- Meffe, G. K., & Vrijenhoek, R. C. (1988). Conservation genetics in the management of desert fishes. *Conservation Biology*, **2**, 157-169.
- Paiva, S. D., Renesto, E., & Zawadzki, C. H. (2005). Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **28**, 370-375.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity*, **86**, 248-249.
- Reis, R. E., Albert, J. S., Di Dario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., & Rocha, L. A. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of fish biology*, **89**, 12-47.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.

- Rogers, A. R., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*, **9**, 552-569.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, **18**, 233-234.
- Shibatta, O. A., Gealh, A. M., & Bennemann, S. T. (2007). Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, **7**, 125-134.
- Shibatta, O. A., & Silva-Souza, Â. T. (2008). Fish, ribeirão do Feijão Basin, São Carlos, São Paulo, Brazil. *Check List*, **4**, 75-78.
- Sofia, S. H., Galindo, B. A., Paula, F. M., Sodr e, L. M., & Martinez, C. B. (2008). Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 317-323.
- Sol e-Cava, A. M., & Matioli, S. R. (2001). Biodiversidade molecular e genética da conserva o. In: *Biologia Molecular e Evolu o. Ribeirão Preto: Holos*, 172-192.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, **10**, 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, **28**, 2731-2739.
- Togawa, R. C., & Br gado, M. M. (2003). PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In *1 st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology-IcoBiCoBi. Ribeirão Preto*.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., & Cushing, C. E. (1980). The river continuum concept. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, **37**(1), 130-137.
- Vieira, C. E. D., Almeida, M. D. S., Galindo, B. A., Pereira, L., & Martinez, C. B. D. R. (2014). Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotropical Ichthyology*, **12**, 153-164.
- Vieira, D. B., & Shibatta, O. A. (2007). Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, **7**, 57-65.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1358-1370.

- Wilson, G. A., & Rannala, B. (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, **163**, 1177-1191.
- Winemiller, K. O., Agostinho, A. A., & Caramaschi, E. P. (2008). Fish ecology in tropical streams. *Tropical stream ecology*, 107-146.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., & Boyle, T. (1999). Popgene v. 1.31. *Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis*.
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, **11**, 1-16.
- Zawadzki, C. H., Renesto, E., de Paiva, S., & Lara-Kamei, M. C. (2004). Allozyme Differentiation of Four Populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a Small Stream in the Upper Rio Paraná Basin, Brazil. *Genetica*, **121**, 251-257.
- Zawadzki, C. H., Renesto, E., Dos Reis, R. E., Moura, M. O., & Mateus, R. P. (2005). Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu reservoir, upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica*, **123**, 271-283.
- Zawadzki, C. H., Renesto, E., Peres, M. D., & Paiva, S. (2008). Allozyme variation among three populations of the armored catfish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Siluriformes, Loricariidae) from the Paraná and Paraguay river basins, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 767-771.
- Zickovich, J. M., & Bohonak, A. J. (2007). Dispersal ability and genetic structure in aquatic invertebrates: a comparative study in southern California streams and reservoirs. *Freshwater Biology*, **52**, 1982-1996.

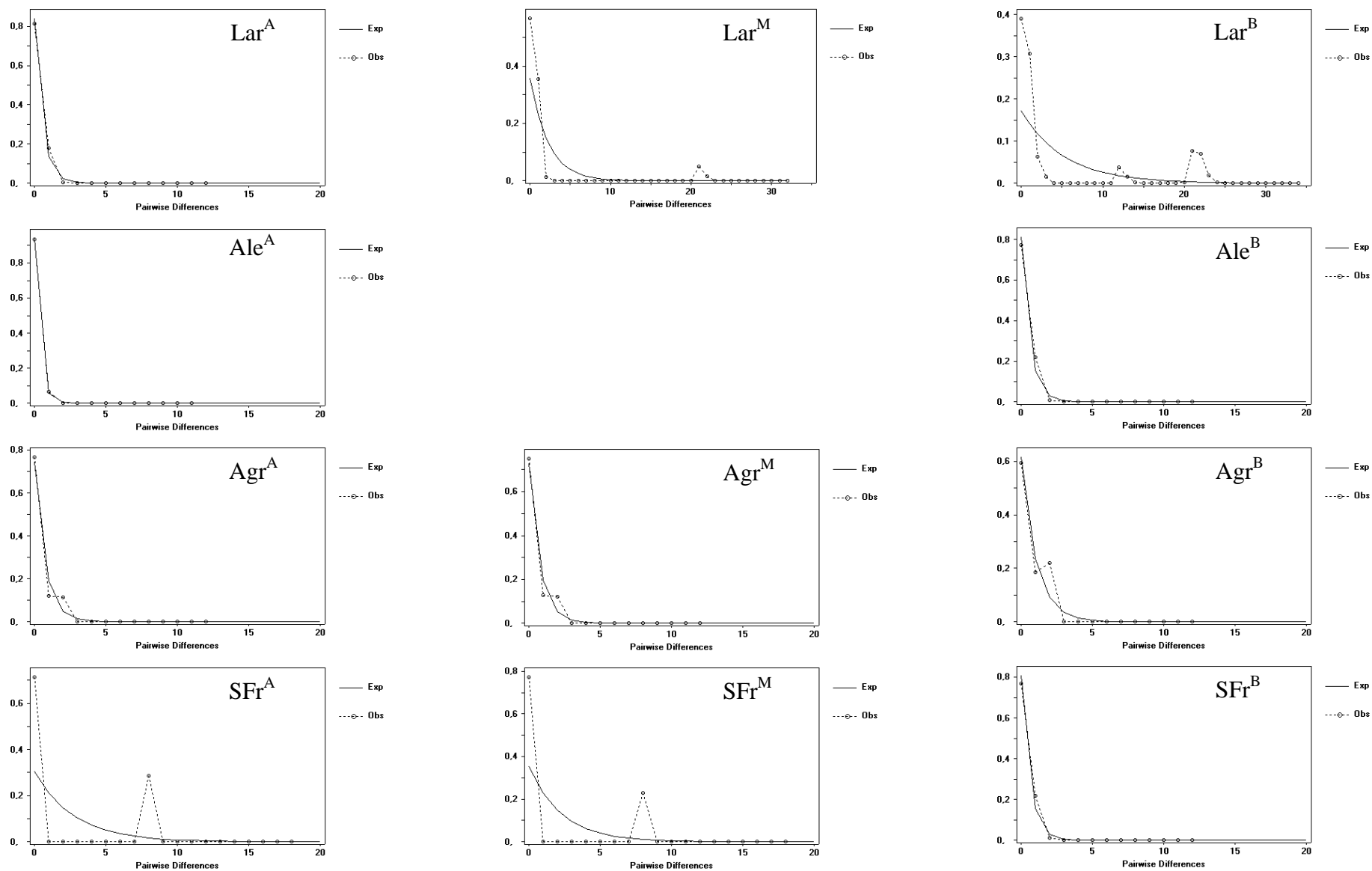
## Tabela Suplementar 1

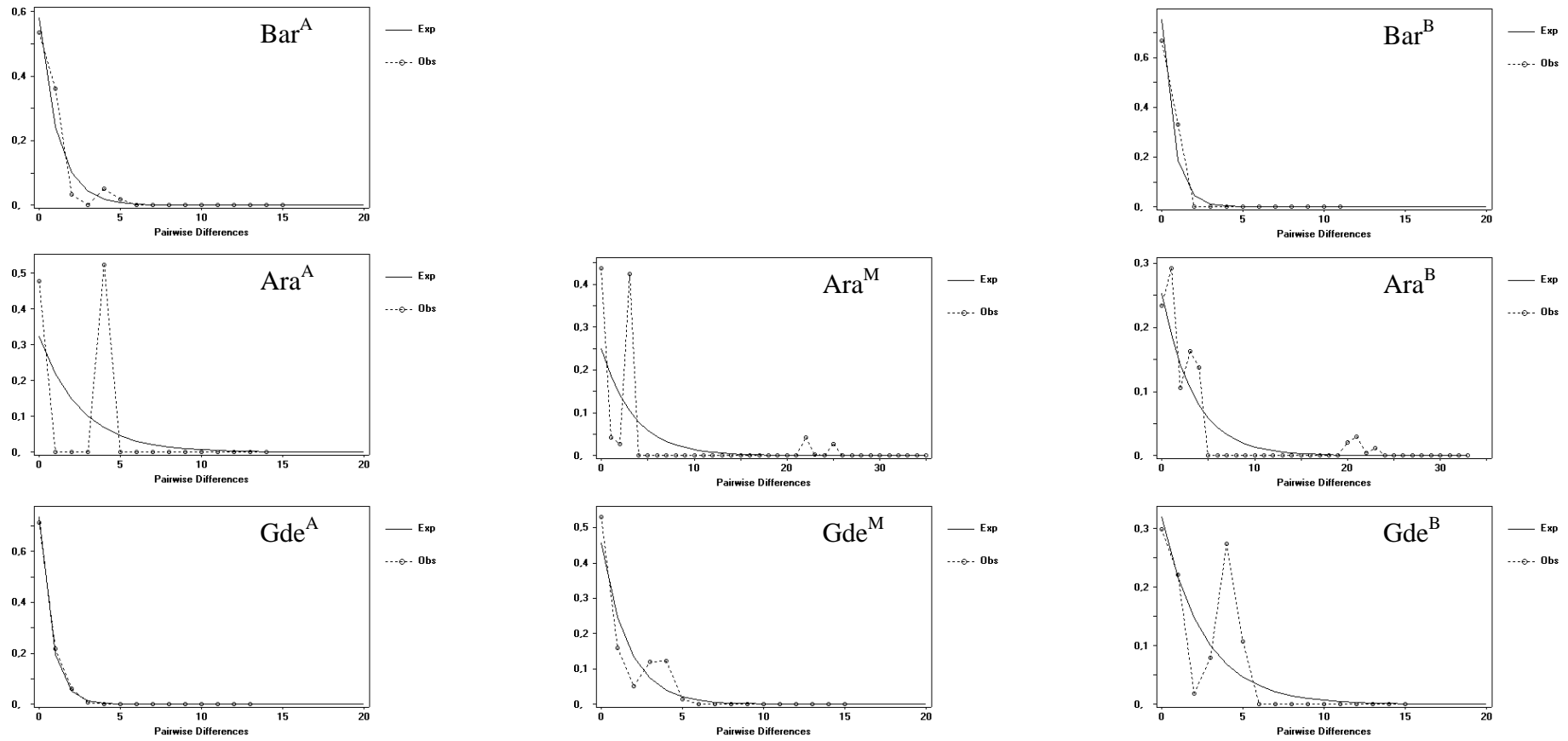
**Tabela 1** Estimativas de fluxo gênico obtida por inferência Bayesiana das taxas de migração utilizando o programa BayesAss. Valores de migrantes e de não migrantes dentro de cada uma das 18 amostras estudadas. Os valores em negrito representam a proporção de não migrantes em cada amostra. Entre parênteses intervalo de confiança (IC).

Proporção de indivíduos não migrantes por trecho amostrado (95% de IC)																	
Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>B</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>B</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>B</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>B</sup>	Ara <sup>A</sup>	Ara <sup>M</sup>	Ara <sup>B</sup>	Gde <sup>A</sup>	Gde <sup>M</sup>	Gde <sup>B</sup>
<b>0,790</b>	<b>0,818</b>	<b>0,806</b>	<b>0,790</b>	<b>0,810</b>	<b>0,798</b>	<b>0,787</b>	<b>0,820</b>	<b>0,780</b>	<b>0,781</b>	<b>0,783</b>	<b>0,810</b>	<b>0,780</b>	<b>0,784</b>	<b>0,830</b>	<b>0,807</b>	<b>0,811</b>	<b>0,799</b>
(0,67-0,97)	(0,67-0,99)	(0,67-0,99)	(0,67-0,96)	(0,68-0,98)	(0,67-0,98)	(0,67-0,97)	(0,67-0,99)	(0,67-0,96)	(0,67-0,96)	(0,67-0,96)	(0,67-0,98)	(0,67-0,96)	(0,67-0,96)	(0,67-0,99)	(0,67-0,98)	(0,68-0,99)	(0,67-0,97)
Proporção de indivíduos migrantes por trecho amostrado (95% de IC)																	
Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>B</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>B</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>B</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>B</sup>	Ara <sup>A</sup>	Ara <sup>M</sup>	Ara <sup>B</sup>	Gde <sup>A</sup>	Gde <sup>M</sup>	Gde <sup>B</sup>
<b>Lar<sup>M</sup></b>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>	Lar <sup>A</sup>
0,012	0,010	0,010	0,012	0,011	0,012	0,012	0,010	0,013	0,012	0,014	0,011	0,012	0,013	0,009	0,010	0,010	0,012
(1,12 <sup>-14</sup> -0,09)	(6,34 <sup>-18</sup> -0,08)	(6,80 <sup>-17</sup> -0,8)	(1,81 <sup>-13</sup> -0,09)	(1,13 <sup>-16</sup> -0,09)	(1,62 <sup>-15</sup> -0,09)	(4,56 <sup>-13</sup> -0,10)	(4,11 <sup>-19</sup> -0,08)	(3,40 <sup>-12</sup> -0,09)	(1,28 <sup>-12</sup> -0,09)	(5,34 <sup>-13</sup> -0,10)	(1,75 <sup>-16</sup> -0,09)	(6,65 <sup>-12</sup> -0,10)	(6,04 <sup>-13</sup> -0,09)	(3,48 <sup>-21</sup> -0,08)	(2,2 <sup>-15</sup> -0,08)	(1,58 <sup>-16</sup> -0,08)	(5,38 <sup>-16</sup> -0,08)
<b>Lar<sup>B</sup></b>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>	Lar <sup>M</sup>
0,013	0,010	0,011	0,013	0,011	0,011	0,011	0,010	0,01	0,012	0,013	0,011	0,012	0,013	0,010	0,010	0,012	0,012
(6,32 <sup>-14</sup> -0,11)	(7,93 <sup>-21</sup> -0,08)	(3,65 <sup>-15</sup> -0,09)	(4,60 <sup>-12</sup> -0,10)	(1,17 <sup>-15</sup> -0,09)	(1,60 <sup>-15</sup> -0,09)	(1,72 <sup>-12</sup> -0,08)	(2,27 <sup>-20</sup> -0,09)	(4,30 <sup>-13</sup> -0,09)	(1,81 <sup>-13</sup> -0,09)	(3,18 <sup>-14</sup> -0,09)	(1,63 <sup>-16</sup> -0,08)	(1,20 <sup>-12</sup> -0,08)	(9,68 <sup>-12</sup> -0,10)	(3,25 <sup>-21</sup> -0,09)	(1,27 <sup>-18</sup> -0,08)	(1,39 <sup>-16</sup> -0,09)	(9,41 <sup>-16</sup> -0,09)
<b>Agr<sup>A</sup></b>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>	Lar <sup>B</sup>
0,013	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,012	0,01	0,011	0,012	0,010	0,013	0,012	0,009	0,011	0,010	0,013
(1,99 <sup>-14</sup> -0,10)	(3,81 <sup>-19</sup> -0,10)	(7,46 <sup>-18</sup> -0,09)	(1,78 <sup>-13</sup> -0,09)	(1,70 <sup>-17</sup> -0,09)	(1,32 <sup>-18</sup> -0,09)	(5,13 <sup>-13</sup> -0,10)	(2,62 <sup>-21</sup> -0,10)	(3,69 <sup>-12</sup> -0,08)	(2,03 <sup>-13</sup> -0,09)	(1,73 <sup>-13</sup> -0,09)	(2,11 <sup>-17</sup> -0,08)	(5,08 <sup>-14</sup> -0,10)	(1,03 <sup>-13</sup> -0,08)	(2,50 <sup>-21</sup> -0,08)	(2,26 <sup>-16</sup> -0,08)	(1,18 <sup>-17</sup> -0,08)	(4,28 <sup>-16</sup> -0,10)
<b>Agr<sup>M</sup></b>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>	Agr <sup>A</sup>
0,012	0,010	0,011	0,011	0,012	0,014	0,012	0,010	0,01	0,012	0,013	0,011	0,011	0,013	0,011	0,011	0,011	0,011
(3,17 <sup>-15</sup> -0,09)	(6,58 <sup>-20</sup> -0,08)	(4,70 <sup>-18</sup> -0,09)	(5,02 <sup>-15</sup> -0,09)	(9,52 <sup>-16</sup> -0,09)	(1,65 <sup>-16</sup> -0,10)	(2,80 <sup>-14</sup> -0,09)	(3,05 <sup>-19</sup> -0,09)	(1,25 <sup>-12</sup> -0,10)	(2,06 <sup>-12</sup> -0,09)	(2,69 <sup>-15</sup> -0,10)	(9,95 <sup>-16</sup> -0,09)	(2,25 <sup>-12</sup> -0,09)	(3,34 <sup>-12</sup> -0,10)	(1,45 <sup>-18</sup> -0,09)	(1,57 <sup>-16</sup> -0,09)	(8,60 <sup>-17</sup> -0,10)	(7,95 <sup>-16</sup> -0,09)
<b>Agr<sup>B</sup></b>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>	Agr <sup>M</sup>
0,012	0,011	0,012	0,012	0,011	0,013	0,012	0,010	0,01	0,013	0,012	0,011	0,013	0,011	0,011	0,011	0,011	0,010
(2,28 <sup>-14</sup> -0,09)	(3,27 <sup>-17</sup> -0,09)	(1,69 <sup>-16</sup> -0,09)	(3,56 <sup>-13</sup> -0,09)	(5,57 <sup>-17</sup> -0,09)	(6,18 <sup>-18</sup> -0,09)	(9,20 <sup>-13</sup> -0,09)	(1,00 <sup>-18</sup> -0,08)	(1,79 <sup>-12</sup> -0,08)	(6,20 <sup>-14</sup> -0,10)	(1,44 <sup>-13</sup> -0,10)	(4,73 <sup>-15</sup> -0,09)	(3,50 <sup>-12</sup> -0,09)	(2,84 <sup>-13</sup> -0,08)	(1,10 <sup>-19</sup> -0,09)	(4,11 <sup>-16</sup> -0,09)	(1,40 <sup>-16</sup> -0,09)	(5,05 <sup>-15</sup> -0,08)
<b>SFr<sup>A</sup></b>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>	Agr <sup>B</sup>
0,011	0,010	0,013	0,011	0,012	0,012	0,011	0,011	0,01	0,012	0,013	0,010	0,012	0,012	0,010	0,011	0,011	0,013
(1,07 <sup>-15</sup> -0,09)	(1,03 <sup>-18</sup> -0,08)	(2,36 <sup>-16</sup> -0,10)	(1,09 <sup>-12</sup> -0,08)	(8,43 <sup>-17</sup> -0,10)	(2,17 <sup>-15</sup> -0,09)	(3,98 <sup>-13</sup> -0,08)	(5,25 <sup>-20</sup> -0,09)	(2,28 <sup>-13</sup> -0,08)	(9,97 <sup>-14</sup> -0,10)	(5,41 <sup>-14</sup> -0,10)	(3,38 <sup>-19</sup> -0,09)	(7,87 <sup>-13</sup> -0,10)	(8,30 <sup>-12</sup> -0,09)	(4,77 <sup>-19</sup> -0,09)	(1,60 <sup>-16</sup> -0,08)	(5,99 <sup>-16</sup> -0,08)	(3,84 <sup>-16</sup> -0,11)
<b>SFr<sup>M</sup></b>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>	SFr <sup>A</sup>
0,012	0,010	0,011	0,013	0,012	0,013	0,014	0,012	0,01	0,012	0,012	0,012	0,014	0,012	0,011	0,011	0,011	0,012
(7,58 <sup>-16</sup> -0,10)	(5,24 <sup>-17</sup> -0,09)	(6,13 <sup>-18</sup> -0,09)	(1,69 <sup>-12</sup> -0,10)	(3,52 <sup>-17</sup> -0,10)	(6,58 <sup>-17</sup> -0,10)	(1,81 <sup>-12</sup> -0,10)	(2,34 <sup>-19</sup> -0,10)	(2,45 <sup>-13</sup> -0,10)	(2,15 <sup>-13</sup> -0,10)	(3,89 <sup>-14</sup> -0,10)	(2,05 <sup>-18</sup> -0,10)	(1,69 <sup>-11</sup> -0,10)	(6,79 <sup>-13</sup> -0,09)	(1,79 <sup>-19</sup> -0,09)	(7,86 <sup>-16</sup> -0,09)	(5,08 <sup>-17</sup> -0,08)	(5,45 <sup>-16</sup> -0,09)
<b>SFr<sup>B</sup></b>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>	SFr <sup>M</sup>
0,012	0,009	0,011	0,013	0,011	0,011	0,012	0,010	0,01	0,014	0,014	0,012	0,013	0,013	0,011	0,013	0,011	0,011
(1,60 <sup>-15</sup> -0,07)	(1,06 <sup>-18</sup> -0,08)	(6,38 <sup>-16</sup> -0,09)	(1,45 <sup>-15</sup> -0,09)	(3,71 <sup>-15</sup> -0,10)	(5,23 <sup>-15</sup> -0,09)	(2,14 <sup>-13</sup> -0,09)	(9,38 <sup>-19</sup> -0,09)	(9,36 <sup>-12</sup> -0,11)	(4,18 <sup>-13</sup> -0,11)	(2,50 <sup>-12</sup> -0,10)	(3,95 <sup>-18</sup> -0,10)	(1,86 <sup>-12</sup> -0,10)	(2,27 <sup>-11</sup> -0,10)	(1,82 <sup>-21</sup> -0,10)	(2,13 <sup>-14</sup> -0,10)	(3,48 <sup>-16</sup> -0,08)	(3,14 <sup>-17</sup> -0,09)
<b>Bar<sup>A</sup></b>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>	SFr <sup>B</sup>
0,011	0,010	0,012	0,012	0,010	0,010	0,012	0,010	0,01	0,012	0,013	0,010	0,013	0,013	0,010	0,012	0,013	0,013
(1,46 <sup>-13</sup> -0,08)	(1,87 <sup>-18</sup> -0,09)	(1,04 <sup>-16</sup> -0,10)	(2,70 <sup>-15</sup> -0,10)	(2,19 <sup>-16</sup> -0,09)	(1,85 <sup>-15</sup> -0,08)	(6,73 <sup>-13</sup> -0,09)	(4,53 <sup>-19</sup> -0,08)	(4,47 <sup>-12</sup> -0,09)	(2,0 <sup>-14</sup> -0,10)	(1,66 <sup>-12</sup> -0,09)	(9,78 <sup>-16</sup> -0,08)	(6,86 <sup>-13</sup> -0,10)	(2,83 <sup>-12</sup> -0,09)	(4,49 <sup>-21</sup> -0,08)	(6,30 <sup>-17</sup> -0,10)	(1,22 <sup>-17</sup> -0,10)	(1,15 <sup>-15</sup> -0,11)
<b>Bar<sup>M</sup></b>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>M</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>	Bar <sup>A</sup>
0,013	0,011	0,012	0,013	0,011	0,012	0,012	0,011	0,01	0,014	0,012	0,011	0,011	0,012	0,010	0,012	0,011	0,011
(4,78 <sup>-15</sup> -0,09)	(1,58 <sup>-18</sup> -0,10)	(2,76 <sup>-18</sup> -0,09)	(7,98 <sup>-14</sup> -0,09)	(1,34 <sup>-16</sup> -0,10)	(2,94 <sup>-15</sup> -0,09)	(1,43 <sup>-14</sup> -0,10)	(5,41 <sup>-20</sup> -0,09)	(8,82 <sup>-13</sup> -0,10)	(4,19 <sup>-13</sup> -0,11)	(1,22 <sup>-12</sup> -0,08)	(9,84 <sup>-19</sup> -0,10)	(1,59 <sup>-11</sup> -0,09)	(1,68 <sup>-12</sup> -0,10)	(1,21 <sup>-19</sup> -0,08)	(2,09 <sup>-16</sup> -0,09)	(5,72 <sup>-15</sup> -0,10)	(9,46 <sup>-15</sup> -0,09)

<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>M</sup></b>	<b>Bar<sup>M</sup></b>	<b>Bar<sup>M</sup></b>	<b>Bar<sup>M</sup></b>	<b>Bar<sup>M</sup></b>	<b>Bar<sup>M</sup></b>	<b>Bar<sup>M</sup></b>	
0,013	0,011	0,011	0,011	0,010	0,012	0,012	0,011	0,01	0,014	0,014	0,010	0,013	0,013	0,009	0,011	0,012	0,011	
(2,52 <sup>-13</sup> -0,09)	(1,17 <sup>-17</sup> -0,10)	(2,22 <sup>-17</sup> -0,09)	(7,81 <sup>-15</sup> -0,09)	(5,16 <sup>-17</sup> -0,09)	(1,92 <sup>-17</sup> -0,10)	(4,10 <sup>-14</sup> -0,09)	(1,69 <sup>-18</sup> -0,08)	(3,05 <sup>-12</sup> -0,10)	(3,82 <sup>-13</sup> -0,10)	(2,43 <sup>-12</sup> -0,08)	(7,44 <sup>-17</sup> -0,09)	(2,20 <sup>-12</sup> -0,09)	(1,37 <sup>-12</sup> -0,10)	(7,33 <sup>-22</sup> -0,80)	(2,83 <sup>-17</sup> -0,09)	(4,50 <sup>-16</sup> -0,10)	(2,30 <sup>-16</sup> -0,08)	
<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	<b>Bar<sup>B</sup></b>	
0,012	0,012	0,010	0,011	0,011	0,010	0,013	0,010	0,01	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,012	0,012	0,011	0,011	
(9,11 <sup>-15</sup> -0,09)	(3,89 <sup>-18</sup> -0,10)	(3,15 <sup>-15</sup> -0,08)	(1,05 <sup>-13</sup> -0,08)	(4,48 <sup>-18</sup> -0,09)	(7,20 <sup>-14</sup> -0,08)	(3,99 <sup>-14</sup> -0,10)	(5,81 <sup>-18</sup> -0,09)	(4,32 <sup>-13</sup> -0,09)	(7,08 <sup>-14</sup> -0,09)	(2,62 <sup>-14</sup> -0,09)	(1,61 <sup>-17</sup> -0,10)	(6,28 <sup>-12</sup> -0,10)	(7,89 <sup>-12</sup> -0,10)	(1,35 <sup>-19</sup> -0,10)	(1,40 <sup>-16</sup> -0,09)	(2,12 <sup>-17</sup> -0,09)	(1,12 <sup>-16</sup> -0,08)	
<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>A</sup></b>	
0,012	0,013	0,010	0,012	0,011	0,013	0,013	0,011	0,01	0,014	0,013	0,011	0,012	0,012	0,008	0,011	0,011	0,013	
(2,45 <sup>-14</sup> -0,10)	(4,86 <sup>-17</sup> -0,10)	(2,36 <sup>-17</sup> -0,08)	(2,17 <sup>-14</sup> -0,09)	(2,46 <sup>-16</sup> -0,10)	(4,57 <sup>-15</sup> -0,09)	(3,17 <sup>-14</sup> -0,09)	(3,62 <sup>-19</sup> -0,09)	(1,05 <sup>-12</sup> -0,10)	(6,28 <sup>-15</sup> -0,09)	(1,42 <sup>-12</sup> -0,09)	(5,36 <sup>-17</sup> -0,09)	(9,55 <sup>-12</sup> -0,10)	(8,43 <sup>-12</sup> -0,09)	(4,10 <sup>-19</sup> -0,07)	(1,08 <sup>-19</sup> -0,08)	(1,64 <sup>-17</sup> -0,08)	(1,47 <sup>-15</sup> -0,10)	
<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	<b>Ara<sup>M</sup></b>	
0,016	0,012	0,013	0,016	0,012	0,013	0,015	0,011	0,01	0,015	0,014	0,014	0,016	0,017	0,010	0,011	0,011	0,011	
(5,79 <sup>-13</sup> -0,11)	(2,09 <sup>-16</sup> -0,10)	(1,54 <sup>-16</sup> -0,10)	(1,17 <sup>-13</sup> -0,11)	(1,56 <sup>-17</sup> -0,09)	(7,60 <sup>-18</sup> -0,10)	(8,22 <sup>-13</sup> -0,10)	(1,78 <sup>-18</sup> -0,09)	(8,20 <sup>-11</sup> -0,10)	(1,95 <sup>-12</sup> -0,11)	(4,45 <sup>-13</sup> -0,10)	(3,74 <sup>-17</sup> -0,10)	(7,69 <sup>-11</sup> -0,11)	(1,15 <sup>-11</sup> -0,11)	(8,26 <sup>-19</sup> -0,08)	(9,15 <sup>-16</sup> -0,08)	(2,41 <sup>-18</sup> -0,09)	(6,27 <sup>-16</sup> -0,09)	
<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>	<b>Ara<sup>B</sup></b>
0,011	0,010	0,010	0,012	0,011	0,011	0,013	0,011	0,01	0,014	0,012	0,011	0,014	0,012	0,010	0,013	0,013	0,013	
(1,74 <sup>-14</sup> -0,09)	(2,07 <sup>-16</sup> -0,08)	(1,69 <sup>-17</sup> -0,08)	(1,90 <sup>-14</sup> -0,09)	(1,10 <sup>-16</sup> -0,09)	(1,53 <sup>-15</sup> -0,08)	(2,78 <sup>-13</sup> -0,10)	(4,48 <sup>-18</sup> -0,09)	(2,40 <sup>-13</sup> -0,08)	(4,47 <sup>-14</sup> -0,10)	(2,11 <sup>-12</sup> -0,10)	(5,31 <sup>-18</sup> -0,08)	(7,66 <sup>-12</sup> -0,11)	(1,37 <sup>-13</sup> -0,09)	(2,25 <sup>-21</sup> -0,09)	(9,44 <sup>-17</sup> -0,10)	(1,80 <sup>-18</sup> -0,10)	(4,65 <sup>-16</sup> -0,10)	
<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>	<b>Gde<sup>A</sup></b>
0,013	0,010	0,012	0,012	0,012	0,012	0,014	0,009	0,01	0,012	0,012	0,013	0,014	0,013	0,011	0,013	0,010	0,013	
(7,25 <sup>-14</sup> -0,10)	(7,92 <sup>-18</sup> -0,08)	(4,16 <sup>-17</sup> -0,10)	(4,08 <sup>-14</sup> -0,09)	(9,29 <sup>-18</sup> -0,09)	(1,58 <sup>-15</sup> -0,09)	(1,60 <sup>-13</sup> -0,11)	(3,32 <sup>-20</sup> -0,08)	(2,80 <sup>-13</sup> -0,10)	(1,03 <sup>-12</sup> -0,10)	(3,87 <sup>-12</sup> -0,09)	(6,47 <sup>-18</sup> -0,09)	(2,55 <sup>-12</sup> -0,10)	(3,00 <sup>-11</sup> -0,09)	(5,74 <sup>-19</sup> -0,09)	(1,44 <sup>-18</sup> -0,09)	(9,81 <sup>-18</sup> -0,08)	(1,65 <sup>-15</sup> -0,10)	
<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>B</sup></b>	<b>Gde<sup>M</sup></b>
0,013	0,010	0,012	0,011	0,011	0,012	0,013	0,011	0,01	0,014	0,012	0,010	0,012	0,012	0,009	0,012	0,011	0,011	
(6,11 <sup>-14</sup> -0,09)	(1,91 <sup>-20</sup> -0,09)	(8,08 <sup>-16</sup> -0,10)	(1,08 <sup>-14</sup> -0,09)	(1,05 <sup>-17</sup> -0,09)	(1,26 <sup>-14</sup> -0,10)	(3,35 <sup>-15</sup> -0,10)	(4,88 <sup>-18</sup> -0,09)	(6,38 <sup>-15</sup> -0,09)	(7,32 <sup>-13</sup> -0,10)	(4,54 <sup>-13</sup> -0,09)	(1,39 <sup>-17</sup> -0,09)	(3,35 <sup>-12</sup> -0,09)	(2,43 <sup>-13</sup> -0,09)	(4,21 <sup>-23</sup> -0,09)	(2,42 <sup>-17</sup> -0,09)	(2,32 <sup>-17</sup> -0,08)	(9,65 <sup>-16</sup> -0,10)	

Figura Suplementar 1





**Fig. 1** Distribuição *mismatch* para os haplótipos mitocondriais obtidos para *Hypostomus ancistroides* ao longo das 21 localidades amostradas, considerando cada ponto individualmente.