



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SAME COSTA LIMA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E VARIAÇÃO TEMPORAL
DE OVOS E LARVAS DE PEIXES (TELEOSTEI:
OSTEICHTHYES) EM ZONAS DE INFLUÊNCIA DE
RESERVATÓRIOS NO RIO PARANAPANEMA**

Londrina
2016



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SAME COSTA LIMA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E VARIAÇÃO TEMPORAL
DE OVOS E LARVAS DE PEIXES (TELEOSTEI:
OSTEICHTHYES) EM ZONAS DE INFLUÊNCIA DE
RESERVATÓRIOS NO RIO PARANAPANEMA**

SAME COSTA LIMA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E VARIAÇÃO TEMPORAL
DE OVOS E LARVAS DE PEIXES (TELEOSTEI:
OSTEICHTHYES) EM ZONAS DE INFLUÊNCIA DE
RESERVATÓRIOS NO RIO PARANAPANEMA**

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: Dra. Fernanda Simões de Almeida.

Londrina
2016

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

Lima , Same Costa.

Identificação molecular e variação temporal de ovos e larvas de peixes (Teleostei: Osteichthyes) em zonas de influência de reservatórios no rio Paranapanema / Same Costa Lima . - Londrina, 2016.
101 f. : il.

Orientador: Fernanda Simões de Almeida .

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Reservatórios, recrutamento, ictioplâncton e DNA barcoding. - Teses. I. Simões de Almeida , Fernanda . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

SAME COSTA LIMA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E VARIAÇÃO TEMPORAL DE
OVOS E LARVAS DE PEIXES (TELEOSTEI: OSTEICHTHYES)
EM ZONAS DE INFLUÊNCIA DE RESERVATÓRIOS NO RIO
PARANAPANEMA**

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

Orientadora: Dra. Fernanda Simões de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. José Luís Oliván Birindelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira
Universidade Federal da Integração Latino –
Americana - UNILA

Londrina, 23 de fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para sua realização, e em especial a todos os seres vivos que deram à vida em prol da ciência.

AGRADECIMENTOS

É com grande emoção por estar completando mais uma etapa tão sonhada e desejada da vida acadêmica que agradeço primeiramente aos queridos professores. À professora Eliana no ensino fundamental, agradeço as aulas e feiras de ciências tão empolgantes e que desde de cedo despertaram o amor pela ciência e aos animais. Aos professores que tive na graduação, pelo carinho com que ensinavam, mas em especial ao professor Bruno Galindo por ser um grande exemplo de pessoa, me acolheu em seu laboratório e me deu a oportunidade de fazer parte da família Gecon.

Aos professores da pós-graduação, por todo o conhecimento adquirido ao longo do curso, e em especial à minha orientadora professora Fernanda Simões de Almeida por ser exemplo a se seguir, obrigada por toda a paciência, carinho, ajuda, conhecimento, encorajamento e por me fazer sentir quase como uma filha. Agradeço a professora Silvia Sofia pelo exemplo de pessoa que ela é, pelas horas de seriedade que se instalavam no laboratório com a presença da Dona onça, e também pelas horas de descontração em momentos felizes de comemoração. Às professoras Fernanda e Silvia, muito obrigado por me acolherem e tornarem parte da família Lagea.

Obrigada a Universidade Estadual de Londrina e ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, bem como aos coordenadores pela possibilidade de realizar um curso de qualidade em um ambiente tão acolhedor.

Agradeço a todos os colegas de curso por terem sido parte em algum momento da minha vida.

Agradeço às equipes Lagea e Lepib, em especial ao professor Mário Orsi pelo suporte, companheirismo e ajuda ao longo do curso. Agradeço especialmente aos amigos Camilinha, Carol, Dhiego, Raul, Faustinho, Wilson, Carlos, Douglas e Lenice por toda amizade, companheirismo e por sempre se fazerem presentes em minha vida. Agradeço também as amigas Mah, Aline e Josi por tanto carinho após tanto tempo de amizade e por torcerem tanto por mim. Obrigada ao pessoal da Rep. Arizona: Jéssica Porfírio, Mari, Jota, Mo e Renan por sempre me oferecem um cantinho quando precisava.

Agradeço aos meus pais Maria Lima e João Edson por todo amor e por acreditarem nos meus sonhos e no meu potencial. Às minhas irmãs Michele e Ana por fazerem parte do que eu sou e em especial à minha irmã Moema por ser a outra parte de mim, tão diferente, porém tão igual, o que torna nossa amizade especial e os caminhos sempre paralelos. Agradeço ao meu amor Bruno e a sua mãe (e que considero como minha também) Rosângela por todo o amor, carinho, incentivo e paciência. Agradeço aos meus padrinhos Vanilda e Carlos pelo amor e cuidados desde a infância sempre incentivando os estudos.

Agradeço sobretudo à **Deus**, pois antes de nascer ele já havia preparado todas estas pessoas e todos estes caminhos para que eu me tornasse uma pessoa melhor. Obrigada pai, por sempre olhar por mim nos momentos de dificuldade em que eu preferia confiar minha vida ao Senhor.

“Considerai como crescem os lírios do campo: eles não tecem e nem fiam, contudo vos digo que nem Salomão em toda a sua glória se vestiu como um deles”

Lucas 12:27

LIMA, Same Costa. **Identificação molecular de ovos e larvas de peixes (Teleostei: Osteichthyes) em zonas de influência de reservatórios no rio Paranapanema.** 2016. 101f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular como requisito parcial para obtenção do título de Mestre - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A intensa construção de barragens e formação de reservatórios constitui o principal fator de impacto nas bacias hidrográficas brasileiras levando a uma série de distúrbios físico-químicos o que acaba por influenciar sobre a reprodução das espécies de peixes ali presentes e interferir diretamente na composição da ictiofauna. Informações sobre uma comunidade se tornam mais completas quando incluídas informações sobre a história de vida das espécies, inclusive nos estágios iniciais. Assim, a análise da composição e abundância de ovos e larvas de peixes é fundamental no sentido de trazer informações sobre o sucesso de permanência das espécies através da reprodução em razão dos distúrbios causados por barramentos. Este trabalho objetivou por meio da técnica *DNA barcoding* realizar a identificação de ovos e larvas de peixes coletados em zonas de influência de barragens inseridas ao longo do rio Paranapanema, para avaliar a composição e abundância do ictioplâncton em diferentes períodos e com diferentes características ambientais. Para tanto, foram realizadas coletas entre setembro 2013 a março de 2014 e setembro de 2014 a março de 2015. Das 961 sequências do gene (COI) obtidas a partir das amostras, 850 (88,5%) puderam ser identificadas precisamente a nível específico, totalizando 43 espécies. Considerando o total de amostras analisadas (961), resultaram em 6 ordens, 20 famílias, 38 gêneros e 52 unidades taxonômicas distintas. As ordens mais abundantes foram Siluriformes (52,1%) e Characiformes (40,8%) seguidas dos Perciformes (6%), Cyprinodontiformes (0,5%), Gymnotiformes (0,3%) e Pleuronectiformes (0,1%). Uma maior riqueza de espécies pode ser observada em trechos lóticos de tributários, em especial para o rio das Cinzas e Tibagi, contrastando com a presença marcante de espécies invasoras como *Serrasalmus marginatus* e *Plagioscion squamosissimus* em trechos lênticos. A identificação a nível específico pode revelar entre amostras analisadas cerca de 30% das espécies registradas para a bacia do rio Paranapanema, bem como casos de espécies crípticas, trazendo informações valiosas acerca do recrutamento de peixes ao longo de uma bacia fragmentada por sucessivas barragens, contribuindo para a criação de planos de manejo efetivos.

Palavras-chave: Ictioplâncton, *DNA barcoding*. Conservação. Barragens. Neotropical.

LIMA, Same Costa. **Molecular identification of fish eggs and larvae (Teleostei: Osteichthyes) in catchment areas of reservoirs in the basin of Paranapanema river.** 2016. 101p. Dissertation presented to the Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology as a partial requirement to obtain the title of Master - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Intense construction of dams and formation of reservoirs is the main impact factor in Brazilian basins leading to a number of physico-chemical disorders which ultimately that have influenced on reproduction of the species and directly interfere in the composition of fish populations. Information about community become more complete when included information about the life history of the species, including the early stages. Thus, the analysis of the composition and abundance of fish eggs and larvae is essential in order to bring about successful permanence of the species through reproduction due to the disturbances caused by buses. This study aimed through technical *DNA barcoding* perform the identification of fish eggs and larvae collected in areas of influence of dams placed along the Paranapanema River to assess the composition and abundance of ichthyoplankton. Therefore, collections were carried out between September 2013 to March 2014 and September 2014 to March 2015. Of the 961 sequences of the gene (COI) obtained from the samples, 850 (88.5%) could be identified precisely the specific level totaling 43 species. Considering the total number of samples (961), resulted in 6 orders, 20 families, 38 genera and 52 different taxonomic units. The most abundant orders were Silurifo (52.1%) and Characiformes (40.8%) followed by the Perciformes (6%), Cyprinodontiformes (0.5%), Gymnotiformes (0.3%) and Pleuronectiformes (0.1%). A greater number of species can be observed in lotic stretches of tributaries, especially the Cinzas river and Tibagi river, contrasting with the strong presence of invasive species like *Serrasalmus marginatus* and *Plagioscion squamosissimus* in lentic stretches. Identifying the specific level can reveal between samples analyzed about 30% of the species recorded for the basin of the river Paranapanema, as well as cases of cryptic species, bringing valuable information about the fish recruitment along a fragmented basin by successive dams, contributing to create effective management plans.

Keywords: Ichthyoplankton. DNA barcoding. Conservation. Dams. Neotropical.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Representação do genoma mitocondrial de peixes baseado na espécie *Protopterus dolloi* Bouleger, 1900. Os 13 genes codificadores de proteínas estão representados em suas respectivas posições. Em vermelho destacada a porção 5' do gene COI (648pb), correspondendo a região *Barcoding*. Adaptado de (ZARDOYA; MEYER, 1996)..... 30
- Figura 2 -** Mapa com distribuição dos pontos de coleta ao longo do médio-baixo Paranapanema. Pontos verdes: zonas de influência do reservatório da UHE Rosana, (1) Lagoa 2, (2) Lagoa 1, (3) rio Pirapózinho, (4) rio Pirapó; Pontos vermelhos: zonas de influência do reservatório da UHE Taquaruçu, (5) Anhumas, (6) reservatório Taquaruçu; Pontos rosa: zonas de influência do reservatório da UHE Capivara: (7) Tibagi, (8) rio Taquara, (9) rio Congonhas, (10) baixo Cinzas, (11) rio Laranjinha, (12) médio Cinzas; Ponto branco: zona de influência no reservatório da UHE Canoas I (13); Ponto preto: zona de influência no reservatório da UHE Canoas II (14)..... 37
- Figura 3 -** Exemplos de diferentes morfotipos de larvas capturados ao longo do médio-baixo rio Paranapanema. Espécies identificadas a partir da correspondência com sequências do gene COI para sequências publicadas no banco de dados BOLDsystems®. (A) *Plagioscion squamosissimus* 454r; (B) *Auchenipterus osteomystax* 106r; (C) *Tatia neivai* 206c; (D) *Apareiodon ibitiensis* 156c; (E) *Crenicichla* sp. 130c; (F) *Hoplosternum littorale* 411r; (G) *Hoplias cf. malabaricus* 425r; (H) *Serrasalmus marginatus* 501b; (I) *Pimelodus microstoma* 198c; (J) *Auchenipteridae* 205c; (K) *Eigenimannia* sp. 476b; (L) *Leporinus amblyrhynchus* 338c; (M) *Trachelyopterus galeatus* 426r; (N) *Serrasalmidae* 455b; (O) *Heptapterus* sp. 187c; (P) *Hoplias intermedius* 445b; (Q) *Serrasalmus maculatus* 121c..... 41

- Figura 4** - Dendrograma demonstrando *clusters* formados por sequências de espécies não presentes no banco de dados e sequências com gêneros previamente identificados. Distância genética estimada com base no modelo Kimura-2-Parâmetros e relacionada pelo método de Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através do software MEGA v 6.0. Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada bifurcação, tendo valores inferiores a 70% ocultados. * Sequências para comparação de espécies não depositadas no banco de dados seguidas do número de tombo (MZUEL: coleção ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina); **Sequências retiradas do banco de dados Boldsystems® seguidas de seu código de acesso; Entre parênteses número de indivíduos incluídos nas análises; Representantes de todas as espécies do gênero *Pimelodus* presentes no banco de dados foram incorporadas na análise..... 47
- Figura 5** - Dendrograma demonstrando espécies com profunda distância intraespecífica e espécies com baixa distância interespecífica. Distância genética foi estimada com base no modelo Kimura-2-Parâmetros e relacionada pelo método de Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através do software MEGA v 6.0. Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada bifurcação. **Sequências retiradas do banco de dados Boldsystems® seguidas de seu código de acesso. Ao lado de cada sequência representado o local de origem do espécime; D: Distância genética K2P (%).. 49
- Figura 6** - Densidade média de capturas. Referente ao primeiro período amostrado (setembro de 2013 – março de 2014). Médio-Baixo rio Paranapanema. Estágio de vida: L (Larva); O (Ovo). 51
- Figura 7** - Densidade média de capturas. Referente ao segundo período amostrado (setembro de 2014 – março de 2015). Médio-Baixo rio Paranapanema..... 51
- Figura 8** - Frequências relativa e absoluta por ordem. Referente a setembro de 2013 a março de 2015.. 52

Figura 9 - Número de espécies por ponto. Referente ao primeiro período de amostragem (setembro de 2013 – março de 2014). Baixo e médio rio Paranapanema. Estágio de vida: L (Larva); O (Ovo).....	52
Figura 10 - Número de espécies por ponto. Referente ao segundo período de amostragem (setembro de 2014 – março de 2015). Baixo e médio rio Paranapanema. Estágio de vida: L (Larva); O (Ovo).....	53
Figura 11 - Espécies encontradas por tributários, sub-afluentes, lagoas marginais e reservatórios.	54
Figura 12 - Mapa com distribuição de espécies não nativas e espécies nativas migradoras de longa distância, para o alto rio Paraná, em zonas de influência dos reservatórios estudados. Cores sólidas: espécies invasoras (Da Graça & Pavanelli 2007; Langeani <i>et al.</i> 2007; Alexandre <i>et al.</i> 2008; Júlio Jr. <i>et al.</i> 2009); Padrão: Migradoras de longa distância (Agostinho <i>et al.</i> 2003); Cinza: demais espécies identificadas (1) Lagoa 2, (2) Lagoa 1, (3) rio Pirapózinho, (4) rio Pirapó (5) Anhumas, (6) reservatório Taquaruçu; (7) Tibagi, (8) rio Taquara, (9) rio Congonhas, (10) baixo Cinzas, (11) rio Laranjinha, (12) médio Cinzas; (13) UHE Canoas I, (14) UHE Canoas II; (A) UHE Rosana; (B) UHE Taquaruçu; (C) UHE Capivara; (D) UHE Canoa I; (E) UHE Canoas II; (F) UHE Salto Grande.....	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Espécies identificadas a partir de ovos e larvas ao longo da bacia do médio-baixo rio Paranapanema. N: Número de capturas; BOLD (%): Média das similaridades para taxón mais próximo encontradas através do Sistema de Identificação Boldsystems®; D (%): Média de distância genética dentro dos grupos; VP (%): Vizinho mais próximo; DVP (%): Distância para o táxon mais próximo; EP (%): Erro padrão da média; AC: código de acesso BOLD; MZUEL: Número de tombo da coleção ictiológica Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina. Índices de similaridade considerados neste estudo: 99 – 100% correspondência específica; 94 – 99% congênica; < 94 % correspondência ao nível de família; níveis baseados em Pereira *et al.* (2013). Táxons em não puderam ser identificadas com base apenas no índice de similaridade BOLD, (*) correspondência < 99 %; (**) correspondência <94 %. Em destaque amostra com correspondências múltiplas (>99 %). 43
- Tabela 2** - Resumo da distribuição de frequência relativa das distâncias genéticas K2P intraespecíficas e interespecíficas. Conjunto de dados utilizados englobam apenas sequências de espécimes identificados. Não foram considerados nos cálculos de comparação os grupos com apenas um representante para o grupo. Valores (%). 50

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15	
2.	OBJETIVOS	17	
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	17	
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17	
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17	
3.1	BACIA DO ALTO RIO PARANÁ, O RIO PARANAPANEMA E AS USINAS HIDRELÉTRICAS	17	
3.2	DIVERSIDADE DE PEIXES E ESTUDOS NO RIO PARANAPANEMA	19	
3.3	ALTERAÇÕES CAUSADAS POR BARRAGENS E SUA INFLUÊNCIA NA ICTIOFAUNA.....	20	
3.4	O MONITORAMENTO DE ZONAS DE INFLUÊNCIA DE RESERVATÓRIOS PELO ESTUDO DO ICTIOPLÂNCTON.....	21	
3.5	LIMITAÇÕES NA IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE OVOS E LARVAS DE PEIXES	23	
3.6	GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO E A CORRETA DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES	24	
3.7	MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES	25	
3.8	O DNA BARCODING E SUA EFICIÊNCIA NA IDENTIFICAÇÃO DO ICTIOPLÂNCTON.....	28	
Capítulo 1: Análise da distribuição espacial e temporal de ovos e larvas de peixes (Teleostei: Osteichthyes) em áreas de influência de reservatórios na bacia do rio Paranapanema, através da identificação por DNA <i>Barcode</i>			33
Introdução			34
Material e métodos			36
<i>Área de estudo e coleta de ictioplâncton</i>			36
<i>Extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene COI</i>			37
<i>Qualidade das sequências e análise de dados</i>			38
Resultados			39
<i>Identificação molecular e distância genética</i>			39

<i>Abundância e composição taxonômica de ovos e larvas amostrados</i>	50
Discussão	57
<i>Resolução do status taxonômico do ictioplâncton de espécies do médio-baixo Paranapanema</i>	57
<i>Variação espacial e temporal: densidade do ictioplâncton</i>	61
<i>Variação temporal na composição do ictioplâncton</i>	62
<i>Variação espacial na composição do ictioplâncton</i>	64
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
Informação suporte	78
REFERÊNCIAS GERAIS	88

1. INTRODUÇÃO

Sendo detentor de uma grande rede de cursos d'água o Brasil é consequentemente um dos países com maior riqueza de espécies de peixes de água doce (LOWE-MCCONNELL, 1999). O país comporta, em todas as suas grandes bacias hidrográficas, reservatórios artificiais que em geral são destinados a hidrelétricas ou abastecimento, e acabam por mudar de uma forma marcante a paisagem e características naturais do ambiente (AGOSTINHO et al., 2007). Pouco mais de 700 reservatórios se encontram espalhados pelos rios de todo o país (AGOSTINHO; PELICE; GOMES, 2008), dos quais a grande maioria se concentra na região sudeste (LIERMANN et al., 2012).

Estando quase que totalmente inserido em território nacional, o rio Paraná representa a segunda maior bacia da América do Sul, se tratando de drenagem (LOWE-MCCONNELL, 1999). A região onde está inserido apresenta grande densidade populacional, o que torna a sua situação e a de seus tributários crítica em relação a represamentos, sendo o maior detentor de usinas hidrelétricas da região Neotropical (AGOSTINHO; PELICE; GOMES, 2008). Um importante tributário desta bacia é o rio Paranapanema, possuindo uma extensão de 930 km, onde atualmente encontram-se onze usinas hidrelétricas em operação, o que transforma o curso original do rio em uma sequência de reservatórios justapostos (MAACK, 2002; DUKE ENERGY, 2008).

Devido à presença de reservatórios, a rica ictiofauna do rio Paranapanema, representada por 155 espécies encontra-se sob influência dos distúrbios ocasionados por barramentos (DUKE ENERGY, 2008). Barragens são responsáveis por alterações graves e irreversíveis causadas no regime hidrológico natural dos rios (GRAF, 2006), assim a estreita relação existente entre os regimes de cheia e seca com os principais eventos dos ciclos reprodutivos dos peixes, como maturação dos oócitos, desenvolvimento inicial dos juvenis, migração e desova podem ser afetados, vindo a refletir na composição adulta da comunidade de peixes (AGOSTINHO et al., 2000; AGOSTINHO; PELICICE; GOMES, 2007).

Deste modo, avaliar quais espécies completam com sucesso o processo de recrutamento é imprescindível para traçar medidas eficazes de conservação. Para este fim, estudos sobre a distribuição e abundância do ictioplâncton em reservatórios se torna indispensável ao entendimento da ecologia e da dinâmica populacional, e seu acompanhamento pode fornecer importantes informações sobre as variações anuais no

recrutamento (NAKATANI et al., 1997). Para tanto, a composição e abundância do ictioplâncton se mostra eficiente acerca da avaliação do recrutamento das comunidades de peixes, já que adição de novos membros a população através da reprodução é ponto crucial na biologia de populações de peixes (NAKATANI et al., 2001).

No entanto, a maioria das descrições e ilustrações de ovos, larvas e juvenis para espécies de peixes de água doce, ainda não são bem conhecidas na ciência atual (NAKATANI et al., 2001). Assim a classificação dos produtos reprodutivos torna-se complexa e em alguns casos inviável, uma vez que muitas das características morfológicas ainda não estão desenvolvidas o suficiente para serem analisadas (PEGG et al., 2006; WARD; HANNER; HEBERT, 2009).

Assim, o uso de marcadores moleculares baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) têm sido de extrema importância na discriminação correta de espécies, uma vez que as diferenças e similaridades entre sequências de DNA podem ser utilizadas como parâmetro para relacionar ou diferenciar espécies (FERGUSON, 2002).

As ferramentas moleculares baseadas em DNA mitocondrial estão entre as mais utilizadas como marcadores espécie-específicos devido a sua taxa evolutiva relativamente mais rápida, quando comparado ao DNA nuclear. Dentre estas, as sequências ribossomais 16S (MAYER, DIETZ; KIEFER, 2007), sequências do gene que codifica para a citocromo *b* (TELETCHEA, 2009) e em especial a utilização da porção 5' do gene que codifica para a subunidade 1 da citocromo *c* oxidase (COI), técnica esta conhecida como *DNA barcode*, esta última possuindo um alto poder de discriminação, mesmo para táxons intimamente relacionados (HEBERT et al., 2003).

Uma das grandes vantagens da técnica *DNA barcode* na identificação a partir do ictioplâncton é que ela pode ser aplicada a organismos em seus diferentes estágios do ciclo de vida, nas mais variadas formas (STOECKLE et al., 2003). Além do que a escolha de uma sequência universal aliado a criação de um banco de dados robusto e específico para sequências COI (4.773.735 sequências depositadas) torna a técnica uma maneira rápida e segura de realizar a identificação.

Para tanto, o presente estudo se apresenta como uma maneira de relacionar o ictioplâncton, identificado através do *DNA barcoding*, aos diferentes tipos de ambientes em que foram encontrados podendo assim fornecer informações importantes sobre a reprodução das espécies de peixes na bacia do Paranapanema frente aos impactos ocasionados pela construção de reservatórios em cascata.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Em razão do grande número de barragens construídas ao longo da calha principal do rio Paranapanema e da influência dos distúrbios causados por reservatórios sobre a reprodução de peixes o presente trabalho objetivou realizar a identificação dos ovos e larvas peixes coletados em zonas de influência por reservatórios com o intuito de avaliar a distribuição e abundância do ictioplâncton em diferentes períodos e ambientes influenciados por barramentos no sentido de trazer informações acerca do processo de recrutamento das comunidades ali presentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a variação temporal entre o ictioplâncton de dois períodos consecutivos de amostragem, analisando a composição e a abundância das espécies identificadas a partir do *DNA barcoding*.
- Relacionar a presença das espécies identificadas e suas estratégias reprodutivas aos diferentes tipos de ambientes em que foram encontradas. Podendo trazer novos dados e informações que colaborem para a problemática do recrutamento e a distribuição das comunidades das espécies de peixes ao longo de uma bacia fragmentadas por barragens.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 BACIA DO ALTO RIO PARANÁ, O RIO PARANAPANEMA E AS USINAS HIDRELÉTRICAS

O Brasil possui uma grande rede de cursos d'água, vistos como sinônimo de riqueza natural e que têm sido nos últimos anos intensamente explorados para benefício humano. De acordo com o relatório apresentado pela Agência Nacional de Energia Elétrica do Brasil (ANEEL, 2012), as usinas hidrelétricas ainda constituem a principal

fonte geradora de energia do país, com 204 empreendimentos, os quais representam 66% de toda potência instalada.

Entre os muitos sistemas hídricos do Brasil, está uma das maiores redes hidrográficas do mundo, o rio Paraná. Este é o principal rio da Bacia da Prata e o segundo maior sistema de drenagem da América do Sul (3,2 milhões de Km²). Seu trecho superior, e parte do médio encontram-se em território brasileiro, drenando uma área de 891.000 Km² (AGOSTINHO; VAZOLLER; THOMAZ, 1995; LOWE-MCCONNELL, 1999). O rio Paraná representa não só uma das mais extensas redes hidrográficas do país, mas um dos sistemas mais intensamente explorados por barragens, apresentando cerca de menos de 45% de seus trechos livres de barramentos (LIERMANN et al., 2012).

Desde a segunda metade do século XIX, o rio Paraná e seus principais afluentes têm sido cada vez mais utilizados para a geração de energia hidrelétrica, através da construção de barragens (LOWE-MCCONNELL, 1999; AGOSTINHO; PELICE; GOMES, 2008). Assim, um importante afluente da bacia e igualmente represado é o rio Paranapanema, inserido à margem esquerda do rio Paraná possui uma extensão de aproximadamente 930 km, dos quais 392,9 km formam uma divisa natural entre os estados de São Paulo e Paraná. Ao longo de sua extensão, no sentido leste-oeste, o rio Paranapanema possui um desnível de aproximadamente 600 metros, com inúmeras corredeiras e cachoeiras (MAACK, 2002).

Dispondo de características geomorfológicas e hidrográficas que o tornaram um dos maiores sistemas em aproveitamento hidrelétrico no contexto da matriz energética brasileira. Atualmente, este importante tributário possui onze usinas hidrelétricas em operação, que estão inseridas da nascente para a foz na seguinte ordem: Jurumirim, Piraju, Chavantes, Paranapanema, Ourinhos, Salto Grande, Canoas II, Canoas I, Capirava, Taquaruçu e Rosana, transformando o curso original do rio em uma sequência de reservatórios justapostos (DUKE ENERGY, 2008).

O aproveitamento do rio Paranapanema para a geração de energia elétrica se iniciou em 1936 com a edificação da primeira usina hidrelétrica (UHE) a Paranapanema. Em relação a potência instalada, as UHEs com a maior potência instalada estão são a UHE Capivara (619 MW) e UHE Taquaruçu (526 MW). E de acordo com as características e formas de operação apresentadas, são classificados como reservatórios de acumulação os das UHEs Capivara, Jurumirim e Chavantes, e os demais como reservatórios de fio d'água (DUKE ENERGY, 2008).

3.2 DIVERSIDADE DE PEIXES E ESTUDOS NO RIO PARANAPANEMA

Os peixes estão entre o grupo de vertebrados mais diversificados, contando com um grande número de espécies. Dados de literatura recente como o *Catalog of fishes* (ESCHMEYER; FONG, 2016) apontam para cerca de 55.000 espécies e subespécies de peixes, das quais 243 foram descritas em 2015.

São também organismos com grande representatividade em sistemas dulcícolas, sendo que do total de todas as espécies, cerca de 40% vivem exclusivamente nos lagos e rios de água doce, os quais cobrem apenas 1% da superfície da Terra e constituem pouco menos 0,01% de toda a água do mundo (BERRA, 2001). Estima-se que águas continentais da região Neotropical abriguem aproximadamente 70% de todo o conjunto de espécies de peixes continentais do mundo, contando com 4.475 espécies válidas descritas (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003; LÉVÊQUE et al., 2008).

Em relação a ictiofauna da bacia do alto rio Paraná, esta apresenta elevados índices de endemismo e conta até o momento com 310 espécies de peixes, distribuídas em 11 ordens e 38 famílias (LANGEANI et al., 2007), dentre estas, 155 espécies são encontradas ao longo de seu afluente o rio Paranapanema (DUKE ENERGY, 2008). A imposição de um sistema barramentos em cascata ao longo desse importante tributário (DUKE ENERGY, 2008) pode, devido a ampliação dos problemas causados por reservatórios, levar a uma mudança na composição da ictiofauna original da bacia (PETESSE; PETRERE JR., 2012). Portanto, os estudos sobre as comunidades de peixes têm se concentrado nos reservatórios presentes ao longo do curso do rio Paranapanema (AGOSTINHO; JÚLIO JÚNIOR; BORGHETTI, 1992; AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2004), pois quando diversos reservatórios são construídos em cascata os impactos cumulativos podem induzir a drásticas reduções da fauna de peixes (AGOSTINHO; GOMES; PELICE, 2007).

Em relação aos estudos realizados em reservatórios, para o trecho do alto Paranapanema, a represa Jurumirim formada em 1962 pela construção da UHE Armando Alvellanal Laydner (DUKE ENERGY, 2008), é a mais estudada desde então. Em levantamento sobre a diversidade de espécies de peixes feita em zonas de influência pela UHE Jurumirim; Carvalho et al. (1998) encontraram 32 espécies, distribuídas em 4 ordens.

Outro levantamento ictiofaunístico mais amplo, realizado por Varela et al. (2007), no médio rio Paranapanema, em um trecho compreendendo uma área sob

influência de seis usinas hidrelétricas a partir da UHE Jurumirim até a UHE de Salto grande, 68 espécies foram encontradas distribuídas em quatro ordens, 18 famílias e 42 gêneros.

Entre os estudos para a região média-baixa do rio Paranapanema, aquele com maior número de espécies encontradas foi o de Orsi (2010), registrando a presença de 79 espécies, distribuídas em cinco ordens, confirmando a predominância das ordens Characiformes e Siluriformes.

A região do baixo Paranapanema, no reservatório UHE Taquaruçu, em termos de composição ictiofaunística é formada por 73 espécies de peixes, em que a ordem Siluriformes predomina, seguida por Characiformes (Britto e Carvalho, 2006). Os autores também realizaram uma relação entre as espécies e sua distribuição espacial, onde a maior riqueza foi registrada na zona fluvial (63 espécies), em comparação a zona lacustre (50 espécies) e de transição (55 espécies).

3.3 ALTERAÇÕES CAUSADAS POR BARRAGENS E SUA INFLUÊNCIA NA ICTIOFAUNA

Variações no fluxo de água e regime hidrológico em ecossistemas de água doce são as principais forças responsáveis pela dinâmica produtiva, ciclagem, distribuição de nutrientes e evolução da biota (DAGA; GUBIANI, 2012). Deste modo, os processos relacionados ao escoamento dos rios podem influenciar tanto na diversidade dos organismos ali presentes quanto na variedade de estratégias ecológicas observadas (GRAF, 2006).

As planícies de inundação apresentam uma grande diversidade de ambientes que são adequados para o desenvolvimento ontogenético e consequente sucesso reprodutivo da ictiofauna (CUNICO; AGOSTINHO; LATINI, 2006). Caracterizadas por períodos de cheia e seca os quais apresentam elevado sincronismo com os principais eventos do ciclo reprodutivo, como a maturação dos oócitos, migração, desova, e desenvolvimento inicial dos juvenis, sendo todos estes de extrema importância para a manutenção da assembleia de peixes (AGOSTINHO et al., 2000; AGOSTINHO; GOMES; PELICE, 2007).

Os barramentos, por sua vez, causam alterações graves e irreversíveis no regime hidrológico natural dos rios, com implicações em seus ecossistemas (GRAF, 2006). As consequências disso são alterações espaciais e temporais na composição da comunidade de peixes, mudanças essas que ocorrem tanto à montante quanto à jusante dos

barramentos e são mais relevantes nos reservatórios construídos em sistema de cascata (AGOSTINHO; PELICE; GOMES, 2008). Assim, a grande densidade de barramentos que apresenta o rio Paranapanema pode fazer com que a composição das comunidades de peixes originais da bacia mude consideravelmente (AGOSTINHO; BENEDITO-CECILIO, 1992; AGOSTINHO et al., 1995).

Além de causarem distúrbios no controle do regime de cheias, barragens influenciam a conexão da calha principal do rio com as áreas sazonalmente alagáveis, vitais para o processo de desova, e desenvolvimento de várias espécies (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2005), além do que, acabam também por interceptar o acesso às áreas de desova (AGOSTINHO; GOMES; PELICE, 2007).

Diversas outras condições impostas após a formação de reservatórios comprometem também a qualidade da água e a recuperação do ambiente, como: a estratificação térmica, formação de camadas anóxicas, concentrações de oxigênio inversamente proporcionais à profundidade, eutrofização, acúmulo de sedimentos e redução da profundidade em relação ao aumento da área alagável ocupada (TUNDISI; STRASKRABA, 1999). Tais distúrbios refletem diretamente na quantidade e qualidade dos tipos de habitats, incidindo sobre a composição da ictiofauna (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2004).

Alterações na composição das comunidades de peixes, seja pela eliminação de um número variável de elementos da ictiofauna local ou pela estocagem de espécies de peixes exóticas ou autóctones, são decorrências esperadas dos represamentos (HAVEL; LEE; ZANDEN, 2005). É esperado também que espécies de peixes generalistas e de pequeno porte aumentem suas populações, enquanto que as migradoras e de grande porte diminuam ou desapareçam da área represada (AGOSTINHO; GOMES; PELICE, 2007).

3.4 O MONITORAMENTO DE ZONAS DE INFLUÊNCIA DE RESERVATÓRIOS PELO ESTUDO DO ICTIOPLÂNCTON

Segundo Wootton, (1984) apud Agostinho et al. (2007) o sucesso alcançado pelos peixes em ambientes distintos deve-se à combinação de habitats, hábitos, fisiologia e comportamentos reprodutivos que irão determinar uma enorme gama de estratégias reprodutivas desenvolvidas pelo grupo. Tais estratégias visam reduzir os custos energéticos de manutenção do indivíduo, aumentar a eficiência na obtenção de energia e assim maximizar a eficiência reprodutiva (NAKATANI et al., 2001).

São múltiplos os fatores responsáveis pelo processo e sucesso reprodutivo, entre eles o desenvolvimento das gônadas estimulado pela elevação da temperatura e do fotoperíodo, e o início da desova sincronizado com o início das cheias (VAZZOLER, 1996; AGOSTINHO; PELICE; GOMES, 2008). De tal modo que, a reprodução de muitas espécies tropicais é sincronizada com a sazonalidade ambiental, que garante condições favoráveis para a sobrevivência do ictioplâncton (BAUMGARTNER et al., 1997), o que é de extrema importância para o recrutamento de peixes e manutenção de suas comunidades. De acordo com Fogarty et al. (1991) o recrutamento baseia-se na adição de novos membros a população através da reprodução, sendo um ponto crucial na biologia de populações de peixes.

O ictioplâncton representa as fases iniciais do ciclo de vida dos peixes na zona planctônica, compreendendo seus os ovos e larvas (SMITH; JOHNSON, 1996). Representando fases críticas ao sucesso do recrutamento, ovos e larvas de peixe são organismos distintos dos adultos em relação aos requerimentos ecológicos e alocação de recursos (NAKATANI et al., 2001; ORSI, 2010). Portanto, a estrutura das assembleias de larvas é resultado de padrões no comportamento de desova dos adultos, que se reproduzem apenas quando as condições são adequadas, como uma tentativa de maximizar a sua aptidão e, conseqüentemente, garantir um número suficiente de sobreviventes (BIALETZK et al., 2005).

Considerando as alterações físicas e químicas causadas por barragens (TUNDISI; STRASKRABA, 1999; GRAF, 2006) e como estas podem influenciar nos fatores e condições ideais para o sucesso reprodutivo (VAZZOLER, 1996) o estudo sobre distribuição e abundância do ictioplâncton em reservatórios se torna indispensável ao entendimento da ecologia e da dinâmica populacional, e seu acompanhamento pode fornecer importantes informações acerca de variações anuais no recrutamento (NAKATANI et al., 1997).

Ao avaliar fatores abióticos influenciando a densidade de larvas de peixe, na bacia do alto rio Paraná, Baumgartner et al. (2008) observou uma correlação entre o período de chuvas e elevação dos níveis de água com a densidade e presença de diferentes espécies de peixes no estágio de vida larval. Comprovando assim, a premissa de que a estratégia reprodutiva de cada espécie está intimamente ligada a fatores ambientais (VAZZOLER, 1996), estando estes, portanto influenciando na abundância das larvas.

Em estudo sobre a distribuição e abundância de larvas e juvenis em 31 reservatórios paranaenses Nakatani et al. (2005) identificaram a presença de 50 grupos

taxonômicos distintos, pertencentes a cinco ordens, onde a ordem Characiformes apresentou o maior número táxons. Dentre todos os reservatórios, os pertencentes as bacias do rio Iguaçu e do rio Paranapanema apresentaram o maior número de grupos taxonômicos.

No entanto, no que diz respeito apenas ao rio Paranapanema poucos estudos que abordam os aspectos da distribuição de ovos e larvas de peixes foram realizados. Dentre esses, podemos citar Kipper et al. (2011) que avaliando a composição taxonômica da assembleia de larvas de peixes em diferentes regiões do reservatório de Rosana, puderam observar diferenças na composição de espécies de larvas, evidenciando a predominância de Siluriformes na região limnética e Characiformes na região litorânea. Os autores consideram de grande importância a análise do ictioplâncton feita em diferentes ambientes, pois estes podem ser utilizados por diferentes espécies para completar seu ciclo de vida.

Vianna e Nogueira, (2008) obtiveram para o rio das Cinzas, bacia do Médio Paranapanema, uma predominância de larvas Siluriformes seguidas por Characiformes. E concluíram, quanto a variação espacial e temporal de espécies, a grande importância deste afluente como rota alternativa para sítios de desova e berçários, já que grandes reservatórios, como o da UHE Capivara, têm agido como barreira direta na rota de peixes migradores.

Apesar das importantes informações obtidas, ao considerarmos toda a extensão da bacia do rio Paranapanema, estes dois trabalhos se restringem a uma pequena área. Além disso, as descrições baseadas em caracteres morfológicos de larvas de peixes de água doce encontram-se dispersas em publicações, sendo muitas delas incompletas e não apresentando os detalhes de todas as fases de desenvolvimento do ictioplâncton (NAKATANI et al., 2001). Portanto, nem todas as amostras de larvas obtidas em ambos os trabalhos tiveram seus *status* taxonômico identificados ao nível de espécie.

3.5 LIMITAÇÕES NA IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE OVOS E LARVAS DE PEIXES

Apesar da grande riqueza de espécies de peixes em ambientes de água doce (NELSON, 2006), os estudos com ictioplâncton iniciados no século XX foram desenvolvidos essencialmente para populações de peixes marinhos, sendo as espécies de água doce são pouco estudadas (NAKATANI et al., 2001).

Embora o estudo da composição e abundância do ictioplâncton se mostre eficiente acerca da avaliação do recrutamento das comunidades de peixes (NAKATANI et al., 1997), a maioria das descrições e ilustrações de ovos, larvas e juvenis para espécies de água doce se encontram dispersas na literatura, bem como um limitado número de especialistas disponíveis (NAKATANI et al., 2001).

Assim, na grande parte dos casos por dificuldades de identificação baseada em caracteres morfológicos, os trabalhos realizados para espécies de água doce têm se limitado a correlacionar a distribuição e abundância de ovos às variáveis ambientais como os níveis de precipitação, a concentração de oxigênio dissolvido, a turbidez da água, a temperatura, e entre outros (MATARESE et al., 2003; BIALETZKI et al., 2005; COSTA; SOUZA-CONCEIÇÃO, 2009).

3.6 GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO E A CORRETA DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES

A biologia da conservação foi desenvolvida em resposta à crise com a qual a diversidade biológica se confronta, abordando três níveis hierárquicos: os ecossistemas, as espécies e os genes (SOULÉ, 1984) apud (BRUZZI, 2007). Uma subárea é a genética da conservação que inclui análises genéticas e moleculares para elucidar aspectos da biologia das espécies. Esta tem como principal objetivo preservar as espécies como unidades dinâmicas evolutivamente significativas, capazes de se adaptarem às mudanças ambientais (FRANKHAM; BALOU; BRISCOE, 2008), e é a diversidade genética quem fornece esse potencial adaptativo/evolutivo à longo prazo (TOWNSEND et al., 2006).

De acordo com Santo et al. (2009), a biodiversidade é um produto da evolução biológica, garantida pela presença de diversidade genética, onde o acúmulo de variações genéticas nos organismos, produzidas por mutação podem ser eliminadas ou transmitidas hereditariamente na mesma população ou entre subpopulações (HARTL; CLARK, 2008). À medida que estas subpopulações assumem caminhos evolutivos independentes seja pela perda natural ou artificial dos mecanismos de fluxo gênico, estas podem ao longo das gerações se fixarem em unidades taxonômicas distintas, no caso diferentes espécies (FRANKHAM; BALOU; BRISCOE, 2008; SANTOS et al., 2009).

A não resolução do status taxonômico ao nível de espécies dos organismos pode fazer com que decisões erradas sejam tomadas em relação às populações, como permitir

que espécies não reconhecidas e que estejam em perigo sejam extintas; espécies em perigo fiquem sem proteção legal, enquanto populações de espécies comuns, ou híbridas, tenham proteção garantida; espécies diagnosticadas incorretamente sejam hibridizadas com outras espécies, reduzindo assim o sucesso reprodutivo; e populações que caso necessário possam ser usadas em outras populações endogâmicas para melhorar o sucesso reprodutivo sejam esquecidas (FRANKHAM; BALOU; BRISCOE, 2008).

As técnicas moleculares podem fornecer uma visão sobre as diferenças entre as espécies, o papel dos indivíduos em uma população e as relações entre as populações, visão esta que pode ser mais bem compreendida quando usada em conjunto com os dados ecológicos, demográficos, comportamentais e fisiológicos (HAIG, 1998).

Portanto, as principais metas dos programas de conservação visando a preservação da biodiversidade, é estabelecer corretamente o status taxonômico dos organismos, bem como a definição de unidades evolutivamente significativas (UES), nos quais o uso de marcadores é essencial para a delimitação de populações geneticamente diferentes, para que assim programas de manejo sejam aplicadas de forma correta (MORITZ, 1994; CRANDALL et al., 2000; HEY et al., 2003).

3.7 MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

A identificação e caracterização dos seres vivos é fundamental no contexto da conservação, assim para garantir que a biodiversidade não seja perdida geneticistas têm buscado metodologias que expliquem e quantifiquem a diversidade em todos os seus níveis (SODRÉ; ALMEIDA; CHIARI, 2002). Para tanto, o desenvolvimento de técnicas modernas de biologia molecular propiciou o surgimento de diversos métodos de detecção de polimorfismo, através do estudo de marcadores moleculares (FERREIRA; GRATAPALLIA, 1995). Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma (SODRÉ; ALMEIDA; CHIARI, 2002).

Os marcadores isoenzimáticos deram início, por volta de 1960, aos primeiros estudos voltados para a identificação de espécies através de técnicas moleculares. Os pioneiros foram Manwell e Backer (1963), que utilizando este marcador evidenciaram a descoberta de uma nova espécie de pepino do mar, baseado no polimorfismo de vários

sistemas de isoenzimas em dois grupos daquela espécie. Apesar destes marcadores serem ainda utilizados para discriminação de espécies de peixes neotropicais (ZAWADZKI et al., 2008; LUCENA et al., 2012), esta é uma técnica que demanda muito trabalho e uma grande quantidade de material biológico fresco, podendo sofrer com as variações de expressão gênica e diversos outros fatores ambientais (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1995; PIORSK et al., 2008). Devido principalmente aos problemas causados pela interferência ambiental na expressão de isoenzimas, outras técnicas baseadas na análise direta da molécula de DNA foram surgindo e ganhando espaço (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

No final da década de 60 a descoberta das enzimas de restrição revolucionou a biologia molecular, pois além de possibilitarem análise direta a nível de DNA apresentam uma sensibilidade muito menor em resposta as variações ambientais (MATIOLI; PASSO-BUENO, 2001). Entre uma de suas aplicações está a detecção de polimorfismos de DNA, consistindo no padrão de fragmentos formado após digerir o DNA com endonucleases, técnica conhecida como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) (MATIOLI; FERNANDES, 2012).

Mas foi após o desenvolvimento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), em meados de 1980, que houve uma verdadeira revolução em termos de estudos genéticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Marcadores moleculares baseados em PCR abriram novas perspectivas para pesquisas em biologia populacional e conservação de espécies como um todo, podendo ser usados como auxiliares para pesquisas em diferentes campos, como por exemplo: para estimar os níveis de heterozigosidade; analisar estruturas familiares, os efeitos da reprodução assexuada na população e determinar o sexo de animais com pouco dimorfismo sexual externo; estimar o tipo de distribuição espacial e temporal das populações em relação ao fluxo gênico; verificar a biodiversidade nominal e os níveis de endemismo e cosmopolitismo das espécies; identificar e acompanhar a dispersão de espécies bioinvasoras; e identificar a origem de produtos industrializados para controlar a comercialização fraudulenta de espécies de venda proibida ou restrita (SOLÉ-CAVA, 2001).

A técnica PCR associada a RFLP, denominada PCR-RFLP, se baseia na amplificação de um fragmento específico do DNA e exposição a enzimas que clivam esta fragmento em sítios específicos de restrição, gerando assim perfis de polimorfismos de DNA, e tais polimorfismos podem ser amplamente utilizados na caracterização e

identificação de diversas espécies (CIVERA, 2003; ABDEL-RAHMAN; AHMED, 2007).

No entanto, a construção e seleção de bibliotecas de clones demanda tempo e exige muita perícia para uso rotineiro de geneticistas e taxonomistas que devem analisar um número grande de indivíduos, além disso, a dependência da presença ou não de um sítio de restrição pode limitar os polimorfismos observados nas análises (KOCHER et al., 1989). Desde então, tem havido uma busca de métodos simples de sequenciamento de regiões de mtDNA visando respostas mais rápidas e mais completas.

Marcadores de origem mitocondrial (mtDNA), em relação aos de origem no DNA nuclear, apresentam muitas características em potencial para a identificação de espécies. Uma vez que a maioria dos animais com reprodução sexuada apresenta um padrão de herança uniparental do mtDNA, este não sofre recombinação meiótica (BALLARD; WHITLOCK, 2004), o que significa que os genes transmitidos às gerações seguintes permanecem inalterados nas matrinhagens até que ocorra uma mutação, tornando as linhagens individuais fáceis de serem identificadas (FREELAND, 2005). Além disso, devido as altas taxas de mutação do mtDNA em relação ao DNA nuclear, mesmo espécies intimamente relacionadas apresentam diferenças suficientes entre seus genomas mitocondriais para que possam ser distinguidas (LINACRE; TOBE, 2011).

No que tange às espécies de peixes, seqüências de regiões do DNA mitocondrial têm sido bem estudadas, e o conhecimento de *primers* universais para amplificação por PCR e posterior sequenciamento tornou-as muito acessíveis (KOCHER; STEPIEN, 1997).

Diversas regiões do mtDNA podem ser sequenciadas e utilizadas na identificação de espécies animais, entre as mais utilizadas para os mais diversos grupos está o gene citocromo b, ou *cyt b* como é conhecido (Kocher et al., 1989; WONG et al., 2004; ZHANG; HANNER, 2012). O sequenciamento da porção do gene *cyt b* foi validado por Branchini et al. (2003) como um método de identificação de espécies, segundo as normas da TWGDAM (*Technical Working Group on DNA Analysis Methods*) e teve por muito tempo uma grande vantagem dentre as técnicas utilizadas para a identificação, devido principalmente ao grande número de seqüências depositadas no banco de dados Genbank, com representantes de uma ampla gama de espécies animais (JACQUES, 2005).

Outros *loci* de genes no genoma mitocondrial têm sido utilizados na identificação das espécies, como exemplos de subunidades 12S e 16S de RNA ribossomal

(GHOVVATI et al., 2009; KOCHZIUS et al., 2010) e genes da família NDH (MAYER, DIETZ; KIEFER, 2007). Porém, no intuito de definir uma única sequência universal para a identificação, Herbert et al. (2003) propuseram que a porção 5' do gene que codifica para a citocromo c oxidase I deveria ser utilizado como um “código de barras da vida” sendo suficiente para discriminar todas as espécies animais, baseado na menor taxa de substituição de aminoácidos em relação do gene Cyt b, o que permitiria a construção de filogenias mais concisas.

O uso desta metodologia, denominada “*DNA barcoding*” ou “Código de barras de DNA”, ganhou grande relevância em 2004 com a criação do “*Consortium for the Barcoding of life (CBOL)*”, cuja meta foi a criação de um banco de dados público com sequências parciais do DNA do gene COI (STOECKLE; HEBERT, 2008), o qual conta até o presente momento com 4,779,799 sequências *barcode*. Neste contexto, as sequências obtidas de espécimes válidos são depositadas em uma base de dados de referência *online* “*Barcoding of Life Data Systems*” (www.boldsystems.org) com o objetivo de facilitar o processo de automação de identificação de espécies.

3.8 O DNA BARCODING E SUA EFICIÊNCIA NA IDENTIFICAÇÃO DO ICTIOPLÂNCTON

Considerando as dificuldades encontradas na identificação de ovos e larvas de peixes a partir da análise de caracteres morfológicos, as técnicas baseadas na biologia molecular vêm sendo de grande auxílio, uma vez que os desenvolvimentos recentes na tecnologia de sequenciamento do DNA possibilitaram o reconhecimento e uso de curtas sequências de DNA mitocondrial como marcador molecular, sendo utilizados para o grupo dos peixes com sucesso (WARD; HANNER; HEBERT, 2009).

O mtDNA é primordialmente envolvido nos processos de respiração celular, e ocorre como uma única molécula dupla hélice de DNA circular, na qual se encontram 22 RNAs transportadores, 2 DNAs ribossomais, uma região controle contendo sítios de início para a replicação e transcrição e 13 genes codificadores de proteínas (FREELAND, 2005). Na posição de marcador molecular possui várias características importantes, dentre elas: genoma de tamanho pequeno, posição e estrutura dos genes relativamente conservados; presença constante em quase todos os animais; número de cópias elevado; sequência de DNA haplóide; herança uniparental; ausência de íntrons; e regiões com evolução mais lenta, o que permite o desenho de *primers* conservados (ZHANG; HEWITT, 1996).

A ausência de enzimas para correção de bases adicionadas erroneamente durante a replicação do mtDNA durante a replicação, faz com que o genoma mitocondrial apresente um elevado número de mutações quando comparado ao nuclear, e as consequências disto são regiões bastante variáveis (BROWN; GEORGE; WILSON, 1979) que podem ser utilizadas para diferenciar indivíduos de espécies diferentes. No entanto, como já foi dito, a maior parte do mtDNA é codificante de proteínas que desempenham papéis vitais, estando assim sujeito a maiores pressões seletivas, o que torna algumas regiões mais conservadas dentro das espécies (WOLF, 1999).

O fato de apresentar todas as características descritas acima o torna especialmente informativo para as questões ao nível de espécie, particularmente quando as relações filogenéticas dizem respeito a táxons intimamente relacionados (RUBINOFF, 2006) como, por exemplo, ao estudarmos duas espécies pertencentes à mesma família, ou até mesmo ao mesmo gênero.

A citocromo *c* oxidase é uma grande proteína transmembrana encontrada na mitocôndria e altamente conservada em espécies que empregam a fosforilação oxidativa para metabolismo. Ela é composta por 10 subunidades nucleares e 3 subunidades sintetizadas na mitocôndria, conhecidas como subunidades I, II e III. A citocromo *c* oxidase subunidade I (COI), é a subunidade catalítica da enzima e é predominantemente embebida na crista da membrana mitocondrial (BERMAN et al, 2000; VOET; VOET; PRATT, 2014).

É de se esperar um nível significativo de restrição quanto a mudanças na forma estrutural da proteína, devido sua natureza catalítico-estrutural, no entanto, os nucleotídeos do gene que a codifica demonstraram uma variação suficiente para serem diferenciados entre espécies (WARD; HANNER; HEBERT, 2009). Isso ocorre em razão do código genético ser degenerado, ou seja, um mesmo aminoácido pode ser codificado por códons de bases nucleotídicas diferentes, permitindo que mutações ocorram em genes codificadores de proteínas (PIERCE, 2011). Deste modo, o COI apresenta uma baixa divergência intraespecífica, no entanto demonstra variação suficiente para ser distinto entre espécies (WAUGH, 2007).

Com base nisso, no sentido de relacionar espécies validamente classificadas, Hebert et al. (2003) propôs que a sequência deste único gene do mtDNA seria suficiente para diferenciar e identificar todas, ou pelo menos a maioria das espécies animais, assumindo o papel do que seria um “código de barras genético” da vida. Para tanto,

utilizaram o sequenciamento da porção 5' do gene mitocondrial que codifica para a citocromo *c* oxidase subunidade 1 (Figura 1) (WARD; HANNER; HEBERT, 2009).

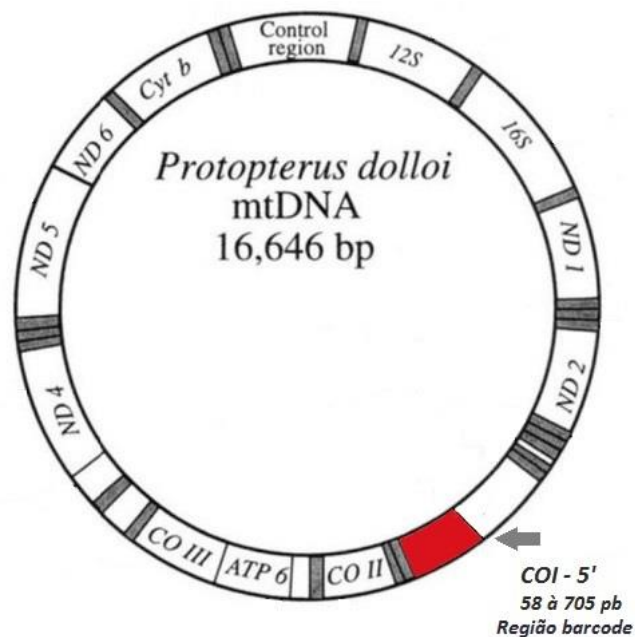


Figura 1. Representação do genoma mitocondrial de peixes baseado na espécie *Protopterus dolloi* Bouleger, 1900. Os 13 genes codificadores de proteínas estão representados em suas respectivas posições. Em vermelho destacada a porção 5' do gene COI (648pb), correspondendo a região *Barcoding*. Adaptado de (ZARDOYA; MEYER, 1996).

Hebert et al. (2003) sequenciou a porção 5' do gene COI de 13.320 táxons, e aplicando entre as sequências cálculos de distância, baseado no modelo de evolução de bases Kymura-2-Parâmetros (K2P), pôde observar diferenças intraespecíficas de apenas 1% e raramente 2%, enquanto que a média para diferenças interespecíficas foi de 11,3%, o suficiente para separá-las a nível de espécie. O modelo de evolução molecular K2P é considerado o melhor quando se considera diferenças genéticas baixas, nele é considerada a razão entre transições e transversões, levando em conta que as substituições mais comuns são as transições (KIMURA, 1980).

Em revisão sobre o potencial e eficiência do *DNA barcoding* Waugh, (2007) pode constatar, a partir dos estudos revisados, um alto grau de resolução taxonômica (>95%) para a maioria das espécies examinadas, com uma média de variação intraespecífica de 1-2% e interespecífica 11,3 %, possibilitando identificar a presença de espécies crípticas.

Esta técnica tem se mostrado eficaz para identificação a nível de espécie em diversos filós diferentes, como por exemplo: para borboletas, (HEBERT et al., 2004a);

pássaros (HEBERT et al., 2004b); larvas de peixes marinhos, (WARD et al., 2005; PEGG et al., 2006), e para peixes continentais de águas Neotropicais em todos seus estágios de vida (PEREIRA et al., 2013; FRANTINE-SILVA et al., 2015).

No que diz respeito às espécies de peixes, com o objetivo de facilitar a identificação por *DNA barcoding*, grupos de trabalhos estão se unindo em prol de um banco de dados específico, “*Fish Barcoding of Life*” (www.fishbol.org), que visa estabelecer uma biblioteca com sequências de referência para o código de barras específico de todos os peixes (WARD; HANNER; HEBERT, 2009). Este conta atualmente com sequências representantes de 115.602 espécies de peixes provenientes de todas as partes do mundo.

O grande conjunto de informações específicas, aliadas ao fato de se poder trabalhar com espécies em seus diferentes estágios do ciclo de vida, e em variadas formas (STOECKLE, 2003) faz com que o *DNA barcoding* se apresente como uma ferramenta poderosa para a resolução taxônômica de ovos e larvas de peixes.

Em trabalho sobre a incerteza taxonômica de larvas de peixe do gênero *Lutjanus*, as quais apresentam características morfológicas parecidas, Victor et al. (2009) pôde com o uso do *DNA barcoding* identificar 99,8% das 330 amostras analisadas, encontrando 11 diferentes espécies. Pegg et al. (2006) comprovou também a eficiência da técnica para discriminação de espécies a partir do ictioplâncton, as sequências COI quando comparadas a sequências da região hiper-variável 1 (HVR1) deram melhores resultados, prontamente discriminando espécies de peixes marinhos pertencentes a três gêneros. Outros estudos de identificação molecular de ovos e larvas de peixes, através da técnica *DNA barcoding*, vêm sendo realizados, tanto para espécies de água doce quanto marinhas (HUBERT et al., 2008; NEIRA; KEANE; 2008; PEREIRA et al., 2011).

Em relação à região Neotropical, em estudo do ictioplâncton realizado no rio Paranapanema, foi possível observar, através das 536 sequências COI, a presença de 37 espécies, o que representa cerca de 30% das espécies de peixes já registradas para a bacia. A similaridade para sequências depositadas no banco de dados foi superior a 99%, demonstrando a eficácia da metodologia na identificação de peixes sul-americanos e sua importância na obtenção de informações mais precisas e cruciais na elaboração de planos de conservação (FRANTINE-SILVA et al., 2015). Portanto, a possibilidade de obter informações à nível molecular, aliadas ao conhecimento especializado em taxonomia podem fornecer importantes dados acerca da ecologia e evolução de espécies

de peixes (WAUGH, 2007). O que torna essencial os estudos com marcadores moleculares, em especial o *DNA barcoding*, na avaliação da comunidade de peixes.

1 **Capítulo 1: Análise da distribuição espacial e temporal de ovos e larvas de peixes**
2 **(Teleostei: Osteichthyes) em áreas de influência de reservatórios na bacia do rio**
3 **Paranapanema, através da identificação por *DNA Barcode*.**

4
5 S. C. LIMA¹ e F.S. ALMEIDA¹

6 Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências
7 Biológicas, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, 86057-970,
8 Londrina-PR, Brasil.

9
10 **RESUMO**

11
12 A construção de barramentos são uma das principais causas da perda da biodiversidade de
13 peixes nas bacias Sul-Americanas, em especial para o alto rio Paraná. A formação de um
14 reservatório é sucedida por grandes transformações, impactando fortemente a ictiofauna local
15 e comprometendo o ciclo reprodutivo de grande parte das espécies. Deste modo, avaliar quais
16 espécies completam efetivamente o recrutamento populacional é imprescindível para traçar
17 medidas de conservação eficazes. Uma das abordagens mais eficientes para avaliação do
18 processo de recrutamento é a quantificação e identificação de ovos e larvas, no entanto, a
19 identificação de indivíduos nestas fases do desenvolvimento é extremamente complexa. Neste
20 contexto, o presente estudo identificou através do *DNA barcoding* os produtos reprodutivos
21 de peixes (ovos e larvas) capturados em zonas de influência de barramentos inseridos ao
22 longo do médio-baixo rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná. Das 961 sequências (403
23 larvas e 558 ovos) confrontadas com o banco de dados Boldsystems®, 850 (88,5%) puderam
24 ser identificadas precisamente a nível específico, resultando em 43 espécies com similaridade
25 superior a 99% para sequências devidamente validadas. A distribuição das espécies
26 identificadas evidenciou uma maior diversidade em locais com características fluviais lótic
27 e semi-lóticas, como a calha principal de grandes tributários inseridos no rio Paranapanema,
28 como o rio Tibagi e o rio das Cinzas. Em contrapartida, trechos sem nenhum ou com
29 pequenos tributários apresentaram maior abundância para espécies não nativas do alto Paraná,
30 demonstrando a importância dos tributários para a reprodução e manutenção de espécies
31 nativas do rio Paranapanema.

32
33 **Palavras-chave:** Ictioplâncton, *DNA barcoding*, reservatórios, conservação.

34
35
36
37
38
39
40
41
42

¹ Autor Correspondente: Same Costa Lima;
E-mail: sameuenp@gmail.com

43 **Introdução**

44 O recrutamento tem papel fundamental na manutenção da espécie no ambiente, e para
45 que este se complete com sucesso, as adaptações particulares de cada espécie, adquiridas ao
46 longo de sua história evolutiva devem estar em sincronia com as condições ambientais nas
47 quais foram moldadas (Nakatani *et al.* 2001; Agostinho *et al.* 2007a). Neste contexto, as
48 perturbações causadas pela intensa construção de barragens em drenagens do Sul da América
49 do Sul, vêm modificando as condições naturais do ambiente, podendo por sua vez alterar o
50 ciclo reprodutivo natural de peixes (Agostinho *et al.* 2008).

51 Apesar da ictiofauna megadiversa de rios neotropicais, grande parte das espécies
52 carecem de adaptações para persistirem em locais impactados por barragens (Agostinho *et al.*
53 2007a). Assim, verificar quem de fato, apesar de tais perturbações, esta conseguindo se
54 reproduzir é fundamental na avaliação e caracterização das comunidades de peixes ali
55 presentes, e isto pode garantir que planos de manejo sejam realizados de forma correta e
56 eficaz.

57 Uma vez que a incorporação de novos indivíduos à população adulta ocorre através da
58 reprodução, uma das maneiras mais eficazes para a caracterização das comunidades e
59 avaliação das espécies bem sucedidas em determinado ambiente é através da análise de
60 distribuição e abundância do ictioplâncton. Isso é imprescindível no entendimento da ecologia
61 e da dinâmica populacional, pois pode fornecer importantes informações acerca de variações
62 anuais no recrutamento (Nakatani *et al.* 1997).

63 A correta identificação do ictioplâncton é fundamental, entretanto, a maioria das
64 descrições e ilustrações de ovos, larvas e juvenis para espécies de peixes, tanto marinhos
65 quanto de água doce, ainda são escassas na ciência atual (Nakatani *et al.* 2001). A
66 classificação por caracteres morfológicos em estágios de vida iniciais é extremamente

67 complexa e demanda muito tempo (Ward *et al.* 2009), o que faz com que ovos e em alguns
68 casos larvas pouco desenvolvidas sejam excluídas das análises (Ziober *et al.* 2012; Britto &
69 Carvalho, 2013).

70 A não resolução do status taxonômico dos organismos pode fazer com que decisões
71 erradas sejam tomadas em relação às suas populações (Frankham *et al.* 2008). Assim a
72 utilização de marcadores moleculares no contexto de discriminar espécies corretamente, em
73 especial a técnica proposta por Hebert *et al.* (2003) conhecida como “*DNA barcoding*”, vêm
74 sendo aplicada com sucesso na identificação do ictioplâncton (Pegg *et al.* 2006; Valdez-
75 Moreno *et al.* 2010; Ko *et al.* 2013; Hubert *et al.* 2015). Este marcador foi utilizado com
76 grande êxito por Frantine-Silva *et al.* (2015), na identificação de ictioplâncton de peixes
77 neotropicais, identificando com sucesso 99.5% das amostras a nível específico, demonstrando
78 seu potencial para discriminação da diversa fauna de peixes sul-americanos.

79 Como importante tributário de uma das maiores drenagens da América do Sul (Lowe-
80 McConnell 1999), o rio Paranapanema representa também uma das bacias mais impactadas em
81 relação a construção de barragens voltadas para usinas hidrelétricas (UHEs). Atualmente, o
82 rio conta com 11 UHEs, o que transforma sua calha principal em uma série de reservatórios
83 justapostos (Duke Energy 2008). Os impactos causados pela formação de reservatórios podem
84 ser ampliados quando barragens são construídas em cascata (Agostinho *et al.* 2007), deste
85 modo avaliar o sucesso reprodutivo das espécies de peixe do rio Paranapanema em áreas de
86 influência de seus reservatórios se torna imprescindível.

87 O estudo teve como objetivo através do *DNA barcoding* realizar a identificação dos
88 ovos e larvas de peixes amostrados em zonas de influência por reservatórios inseridos na
89 porção médio-baixa do rio Paranapanema, podendo assim avaliar a variação temporal do
90 ictioplâncton entre dois períodos consecutivos e relacionar a presença das espécies aos

91 diferentes tipos de ambientes em que foram encontradas. E deste modo, obter informações
92 contribuam sobre a problemática do recrutamento de espécies de peixes ao longo de uma
93 bacia fragmentadas por barramentos.

94

95 **Material e métodos**

96 *Área de estudo e coleta de ictioplâncton*

97 Foram delimitados 14 pontos amostrais em zonas de influência de diferentes
98 reservatórios ao longo do médio-baixo rio Paranapanema, levando em consideração a posição
99 dos principais tributários e suas barragens (Fig. 2). As coletas foram realizadas durante o
100 período de maior atividade reprodutiva dos peixes, compreendendo setembro de 2013 a março
101 de 2014, e setembro de 2014 a março de 2015. As amostragens tiveram um esforço de coleta
102 ativa de uma hora ao amanhecer e ao entardecer. As amostras foram obtidas com auxílio de
103 redes de plâncton cônicas, malha 0,5 mm, equipadas com fluxômetro, e a medição da taxa de
104 fluxo foi então usada para determinar a densidade de ovos e larvas de acordo com Nakatani *et*
105 *al.* (2001). As amostras foram conservadas em álcool 70% e armazenadas em frascos
106 identificados. Posteriormente em laboratório ovos e larvas de peixes foram separados do
107 restante do material biológico, em placa tipo Petri utilizando estereomicroscópio.

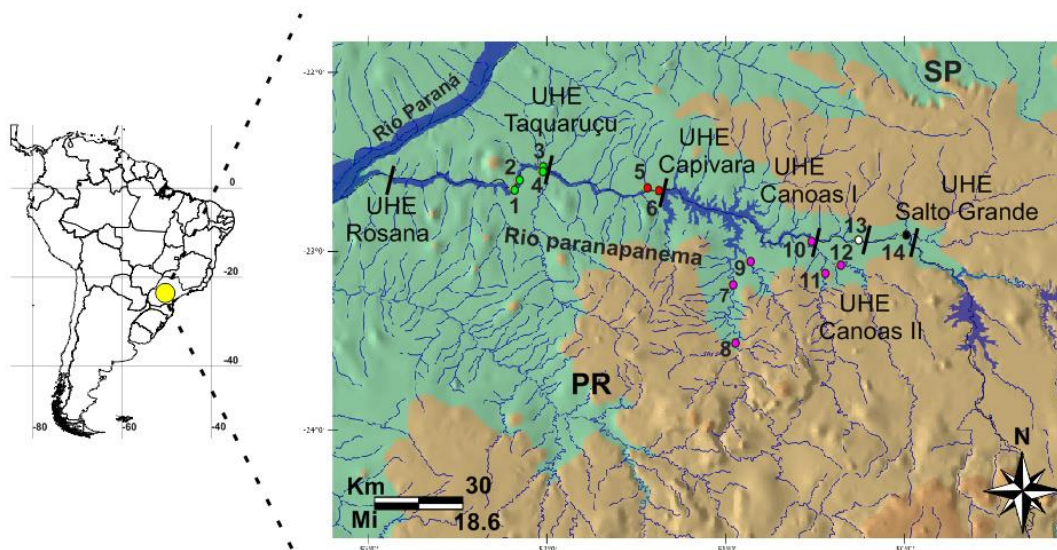


Figura 2. Mapa com distribuição dos pontos de coleta ao longo do médio-baixo Paranapanema. **Pontos verdes:** zonas de influência do reservatório da UHE Rosana, (1) Lagoa 2, (2) Lagoa 1, (3) rio Pirapózinho, (4) rio Pirapó; **Pontos vermelhos:** zonas de influência do reservatório da UHE Taquaruçu, (5) Anhumas, (6) reservatório Taquaruçu; **Pontos rosa:** zonas de influência do reservatório da UHE Capivara: (7) Tibagi, (8) rio Taquara, (9) rio Congonhas, (10) baixo Cinzas, (11) rio Laranjinha, (12) médio Cinzas; **Ponto branco:** zona de influência no reservatório da UHE Canoas I (13); **Ponto preto:** zona de influência no reservatório da UHE Canoas II (14).

117 *Extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene COI*

118 As amostras foram alocadas em placas de 96 poços com 200 ou 100 μ L de tampão de
 119 extração para larvas e ovos, respectivamente. Cada 200 μ L de tampão de extração continha
 120 20mg de Chelex100 (BIO-RAD), 0,1 μ g de proteinase K (Invitrogen) e 200 μ L água ultrapura
 121 autoclavada. Após vedadas, as placas foram colocadas no termociclador e mantidas à 63°C
 122 por 55 min e aquecidas à 90°C por 5 min. O sobrenadante foi retirado e utilizado para
 123 amplificação. As placas estão armazenadas com suas respectivas identificações em freezer à -
 124 20°C.

125 A amplificação da região COI foi realizada com base nos *primers* FishF1 5'-
 126 TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e FishR1 5'- AGACTTCTGGGTGGC
 127 CAAAGAATCA-3' (Ward *et al.* 2005), utilizando o programa: desnaturação inicial de 5 min
 128 à 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30s, 54°C por 30s e 72°C por 1 min, com extensão final de 10
 129 min à 72°C em termociclador MJ Research PTC-100.

130 Cada reação teve volume final de 10 μ L sendo 3,6 μ L de água ultra pura, 5 μ L de kit
131 PCR Go taq® Green Master Mix (Promega), 0,2 μ L de cada *primer* (20 μ M), 0,1 μ L de
132 DNA. Os produtos de PCR tiveram seus fragmentos corados com SYBR® Safe DNA Gel
133 Stain (Life Technologies) e visualizados em gel de agarose 1%. Amostras com sucesso na
134 amplificação, foram purificadas com kit PCR ExoSAP-IT GE Helthcare, segundo o protocolo
135 estabelecido pelo fabricante, visando à eliminação de possíveis interferentes.

136 As amostras purificadas foram sequenciadas em reações de 10 μ L contendo 1 μ L de
137 tampão BigDye (400 mM Tris-HCl pH 9.0 e 10 mM MgCl₂), 2 μ L de BigDye Terminator v.
138 3.1. Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Carls- bad, CA, USA), 0,25 μ L de *primers*
139 FishF1 ou FishR1 (20 μ M) e água para completar o volume. Os produtos das reações foram
140 sequenciados e analisados no sequenciador automático ABI-PRISM 3500 XL (Applied
141 Biosystems).

142 *Qualidade das sequências e análise de dados*

143 As sequências de COI obtidas a partir de ovos e larvas, de ambas as fitas *forward* e
144 *reverse*, com tamanho superior a 600pb foram combinadas para formação de um consenso
145 através do aplicativo online *Electropherogram Quality Analysis* (Togawa & Brigido 2003)
146 disponível em (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), onde o algoritmo CAP3 *contig*
147 (Huang & Madan 1999) foi utilizado para construir um consenso entre as sequencias das fitas
148 *forward* e *reverse* de cada amostra. O mesmo aplicativo utilizou o algoritmo PHRED (Ewing
149 & Green 1998), para determinação do nucleotídeo mais provável em cada posição da
150 sequência consenso.

151 Todas as sequências consenso e aquelas com uma única direção foram submetidas ao
152 banco de dados BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007) (<http://www.boldsystems.org/>) no qual
153 a ferramenta BOLD-IDS (*Identification System*) foi utilizada para verificar a correspondência

154 e similaridade das sequências submetidas com as armazenadas no banco de dados. As
155 sequências com as melhores correspondências para cada táxon (>99%) foram juntamente com
156 as sequências das amostras analisadas incorporadas às análises de distância genética
157 intraespecífica e interespecífica, baseadas no modelo de evolução Kimura-2-Parâmetros
158 (K2P) (Kimura 1980).

159 O mesmo modelo foi aplicado para a construção de uma árvore de distância genética
160 com método Neighbor-Joining (NJ), visando uma representação gráfica da distribuição das
161 distâncias genéticas entre os táxons. As análises de distância e a identificação do segundo
162 táxon com a menor distância interespecífica (vizinho mais próximo), bem como a árvore de
163 Neighbor-Joining foram realizadas através do programa MEGA v6.0 (Tamura *et al.* 2013).
164 Devido ao fato de se trabalhar com estágios de vida iniciais os valores de corte utilizados na
165 definição dos níveis taxonômico foram mais rigorosos. As correspondências para sequências
166 depositadas no Boldsystems com similaridade $\geq 99\%$ determinaram espécie, aquelas de $\leq 98\%$
167 a $\geq 94\%$ definiram o gênero e similaridades inferiores a 94% definiram a família. Os valores
168 utilizados foram baseados em Frantine-Silva *et al.* (2015).

169

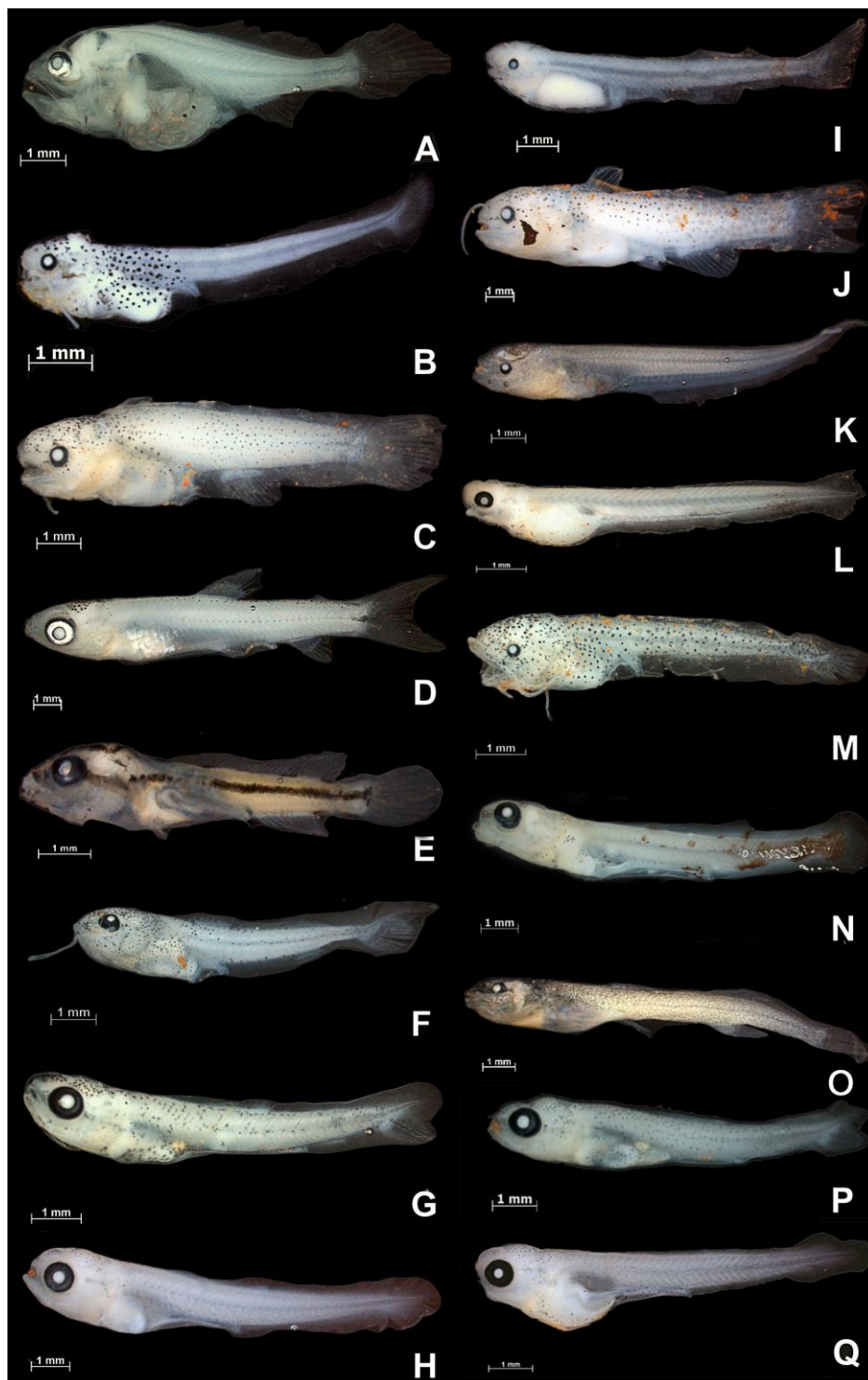
170 **Resultados**

171 *Identificação molecular e distância genética*

172 Durante o primeiro período de amostragem compreendendo setembro de 2013 a março
173 de 2014 foram coletados 6.313 ovos e 438 larvas. Entre setembro de 2014 a março de 2015,
174 segundo período de amostragem, foram coletados 833 ovos e 313 larvas, totalizando ao final
175 destes dois períodos 7.897 amostras.

176 Dentre estas, foram previamente selecionadas de forma aleatória, mas buscando
177 amostrar os diversos morfotipos capturados, 961 amostras entre estas 403 larvas e 558 ovos

178 (Fig. 3). As amostras tiveram seu DNA extraído, o gene *citocromo c oxidase I* (COI)
179 amplificado via PCR e sequenciado com sucesso. A identificação molecular foi baseada na
180 similaridade entre a sequência da amostra e sequência do adulto validamente depositada no
181 banco de dados Boldsytems, e resultou em 6 ordens, 20 famílias, 38 gêneros, 43 espécies com
182 similaridade ao banco de dados superior a 99%, e no total 52 unidades taxonômicas (Tabela
183 1). Considerando apenas identificação a nível específico (43), esta representou 27,7% das 155
184 espécies documentadas para a bacia do rio Paranapanema.



185

186 **Figura 3.** Exemplares de diferentes morfotipos de larvas capturados ao longo do médio-baixo rio Paranapanema.
 187 Espécies identificadas a partir da correspondência com sequências do gene COI para sequências publicadas no
 188 banco de dados Boldsystems®. (A) *Plagioscion squamosissimus* 454r; (B) *Auchenipterus osteomystax* 106r; (C)
 189 *Tatia neivai* 206c; (D) *Apareiodon ibitiensis* 156c; (E) *Crenicichla* sp. 130c; (F) *Hoplosternum littorale* 411r;
 190 (G) *Hoplias* cf. *malabaricus* 425r; (H) *Serrasalmus marginatus* 501b; (I) *Pimelodus microstoma* 198c; (J)
 191 Auchenipteridae 205c; (K) *Eigenimannia* sp. 476b; (L) *Leporinus amblyrhynchus* 338c; (M) *Trachelyopterus*
 192 *galeatus* 426r; (N) Serrasalmidae 455b; (O) *Heptapterus* sp. 187c; (P) *Hoplias intermedius* 445b; (Q)
 193 *Serrasalmus maculatus* 121c.

194 Das 961 amostras analisadas, baseando-se nos valores de corte utilizados por Pereira
195 *et al.* (2013), 850 amostras (88,44%) puderam ser identificadas com precisão a nível de
196 espécie, com uma similaridade média para espécies presentes no banco de dados superior a
197 99%.

198 Considerando espécimes com baixa correspondência 107 (11,13%) puderam ser
199 discriminados a nível de gênero tais como *Pimelodus* sp., *Hypostomus* sp1., *Hypostomus* sp2.,
200 *Heptapterus* sp., *Pimelodella* sp., *Crenicichla* sp. e *Eigenmannia* sp. com uma média de
201 similaridade, para espécimes presente no banco de dados, de 95,8%. Já dentre os espécimes
202 identificados ao nível de família 4 (0,41%) foi possível observar Serrasalminidae e
203 Auchenipteridae, com similaridade média de 90,6% para espécimes depositados (Tabela 1).

204 **Tabela 1.** Espécies identificadas a partir de ovos e larvas ao longo da bacia do médio-baixo rio Paranapanema. **N:** Número de capturas; **BOLD (%)**: Média das similaridades
 205 para taxón mais próximo encontradas através do Sistema de Identificação Boldsistemas®; **D (%)**: Média de distância genética dentro dos grupos; **VP (%)**: Vizinho mais
 206 próximo; **DVP (%)**: Distância para o táxon mais próximo; **EP (%)**: Erro padrão da média; **AC:** código de acesso BOLD; **MZUEL:** Número de tombo da coleção ictiológica
 207 Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina. Índices de similaridade considerados neste estudo: 99 – 100% correspondência específica; 94 – 99% congênica;
 208 < 94 % correspondência ao nível de família; níveis baseados em Pereira *et al.* (2013). Táxons em não puderam ser identificadas com base apenas no índice de similaridade
 209 BOLD, (*) correspondência < 99 %; (**) correspondência < 94 %. Em destaque amostra com correspondências múltiplas (>99 %).

	Melhor Correspondência	N	BOLD ± EP	D ± EP	VP	DVP ± EP
CHARACIFORMES						
Anostomidae						
	<i>Leporinus amblyrhynchus</i> Garavello & Britski, 1987	5	99,55 ± 0,17	1,19 ± 0,31	<i>Leporinus friderici</i>	12,18 ± ,43
	<i>Leporinus friderici</i> (Bloch, 1974)	34	99,35 ± 0,36	0,15 ± 0,07	<i>Leporinus paranensis</i>	6,47 ± 1,02
	<i>Leporinus obtusidens</i> (Valenciennes, 1837)	1	99,65 ± 0	1,17 ± 0,41	<i>Leporinus piavussu</i>	5,09 ± 0,83
	<i>Leporinus octofasciatus</i> Steindachner, 1915	84	99,34 ± 0,11	0,48 ± 0,15	<i>Leporinus paranensis</i>	3,54 ± 0,74
	<i>Leporinus paranensis</i> Garavello & Britski, 1987	6	99,17 ± 0,15	0,13 ± 0,09	<i>Leporinus octofasciatus</i>	3,54 ± 0,74
	<i>Leporinus piavussu</i> Britski, Birindeli & Garavello, 2012	13	99,93 ± 0,02	0,29 ± 0,13	<i>Leporinus obtusidens</i>	5,09 ± 0,83
	<i>Schizodon intermedius</i> Garavello & Britski, 1990	25	99,94 ± 0,01	0,08 ± 0,07	<i>Schizodon nasutus</i>	9,57 ± 1,30
	<i>Schizodon nasutus</i> Kner, 1858	65	99,88 ± 0,02	0,15 ± 0,07	<i>Schizodon intermedius</i>	9,57 ± 1,30
Characidae						
	<i>Astyanax altiparanae</i> (Garutti & Britski, 2000)	3	99,88 ± 0,05	0,17 ± 0,12	<i>Galeocharax knerii</i>	19,44 ± 1,98
	<i>Bryconamericus</i> cf. <i>exodon</i> Eigenmann, 1907	1	99,47 ± 0	x	<i>Bryconamericus turiuba</i> AC: JN988759	1,77 ± 0,59
	<i>Cyphocharax nagelii</i> (Steindachner, 1881)	2	99,95 ± 0,04	0,11 ± 0,11	<i>Schizodon nasutus</i>	18,74 ± 1,94
	<i>Galeocharax knerii</i> (Steindachner, 1879)	2	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Pterygoplichthys anisitsi</i> AC: JN989182	18,39 ± 1,96
	<i>Piabina argentea</i> Reinhardt, 1867	2	99,49 ± 0,16	1,94 ± 0,47	<i>Hypostomus</i> sp1.*	20,27 ± 1,96
Cynodontidae						
	<i>Rhaphiodon vulpinus</i> Spix & Agassiz, 1829	6	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Serrasalmus maculatus</i>	18,49 ± 1,90
Erythrinidae						
	<i>Hoplias</i> cf. <i>malabaricus</i> (Bloch, 1794)	22	99,96 ± 0,01	0,07 ± 0,04	<i>Hoplias intermedius</i> AC: KM897472	1,22 ± 0,43
	<i>Hoplias intermedius</i> (Günther, 1864)	5	99,70 ± 0,03	0,23 ± 0,14	<i>Hoplias intermedius</i> AC: JN988906	4,72 ± 0,86

Melhor Correspondência	N	BOLD ± EP	D ± EP	VP	DVP ± EP
Parodontidae					
<i>Apareiodon affinis</i> (Steindachner, 1879)	20	100 ± 0	0,08 ± 0,08	<i>Apareiodon piracicabae</i>	8,25 ± 1,24
<i>Apareiodon ibitiensis</i> Amaral Campos, 1944	1	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Apareiodon piracicabae</i>	10,10 ± 1,36
<i>Apareiodon piracicabae</i> (Eigenmann, 1907)	11	99,95 ± 0,02	0,13 ± 0,07	<i>Apareiodon affinis</i>	8,25 ± 1,24
Serrasalminidae**					
<i>Metynnus maculatus</i> (Kner, 1858)	2	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Serrasalmus marginatus</i>	15,62 ± 1,71
<i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858	6	100 ± 0	0,10 ± 0,10	<i>Serrasalmus marginatus</i>	5,47 ± 0,98
<i>Serrasalmus marginatus</i> Valenciennes, 1837	68	99,99 ± 0,00	0,09 ± 0,08	<i>Serrasalmus maculatus</i>	5,47 ± 0,98
Triporthidae					
<i>Triporthus nematurus</i> (Kner, 1858)	8	100 ± 0	0,07 ± 0,05	<i>Hypostomus pleostomus</i> AC:NC025584	21,36 ± 1,89
CYPRINODONTIFORMES					
Poeciliidae					
<i>Poecillia reticulata</i> Peters, 1859	5	99,79 ± 0,00	0,06 ± 0,06	<i>Hypostomus sp2.*</i>	24,27 ± 2,33
GYMNOTIFORMES					
Gymnotidae					
<i>Gymnotus carapo</i> Linnaeus, 1758	1	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Pimelodus maculatus</i>	20,41 ± 2,03
Rhamphichthyidae					
<i>Rhamphichthys hahni</i> (Meinken, 1937)	1	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Eigenmania sp.*</i>	23,90 ± 2,28
Sternopygidae					
<i>Eigenmannia sp.*</i>	1	96,99 ± 0	x	<i>Eigenmania virescens</i> AC: GU702092	3,09 ± 0,79
PERCIFORMES					
Cichlidae					
<i>Crenicichla sp.*</i>	1	94,2 ± 0	x	<i>Crenicichla haroldoi</i> AC:JN988829	6,11 ± 1,14
Sciaenidae					
<i>Plagioscion squamosissimus</i> (Heckel, 1840)	57	99,99 ± 0,00	0,01 ± 0,01	Serrasalminidae**	21,47 ± 2,11

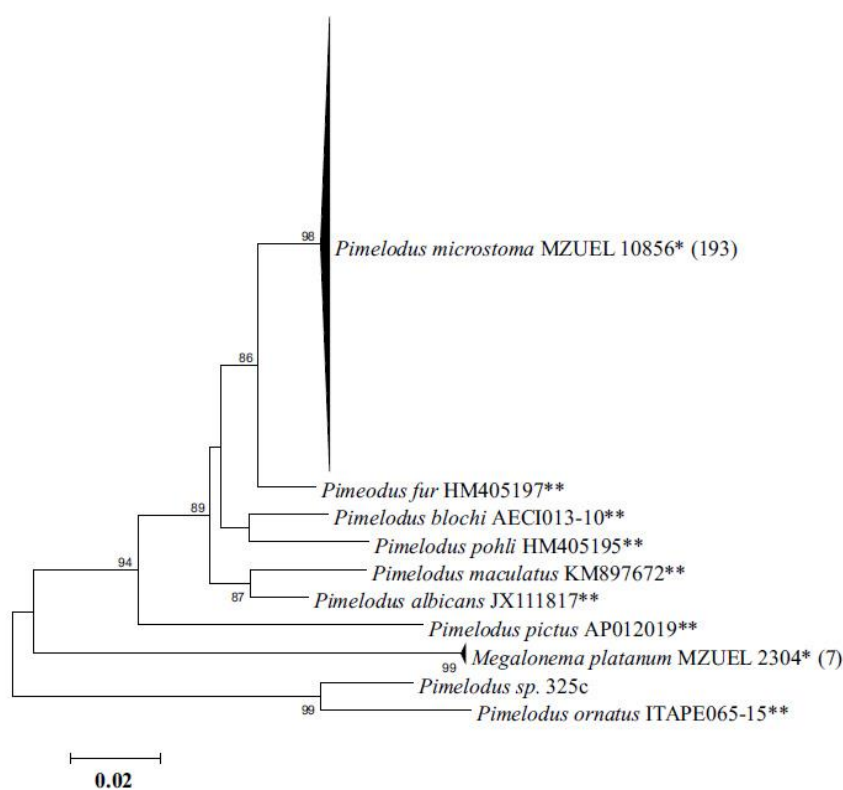
Melhor Correspondência	N	BOLD ± EP	D ± EP	VP	DVP ± EP
PLEURONECTIFORMES					
Achiridae					
<i>Catathyridium jenynsii</i> (Günther, 1862)	1	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Pimelodella</i> sp.*	22,13 ± 2,02
SILURIFORMES					
Auchenipteridae **					
<i>Auchenipterus osteomystax</i> (Miranda Ribeiro, 1918)	28	99,98 ± 0,00	0,03 ± 0,03	<i>Glanidium melanopterum</i> AC:HM064994	11,15 ± 1,48
<i>Tatia neivai</i> (Ihering, 1930)	32	99,66 ± 0,01	0,14 ± 0,07	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	18,50 ± 1,93
<i>Trachelyopterus galeatus</i> (Linnaeus, 1766)	2	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Glanidium melanopterum</i> AC: HM064994	16,15 ± 1,79
				<i>Hypostomus plecostomus</i> AC:NC025584	18,79 ± 1,98
Caliichthyidae					
<i>Corydoras paleatus</i> (Jenyns, 1842)	2	100 ± 0	0,11 ± 0,12	<i>Myloplus</i> sp. AC: ITAPE171-15	18,09 ± 1,78
<i>Hoplosternum littorale</i> (Hancock, 1828)	1	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Piabina argentea</i>	21,68 ± 1,84
Cetopsidae					
<i>Cetopsis gobioides</i> Kner, 1858	1	99,83 ± 0	0,17 ± 0,15	<i>Tatia neivai</i>	18,53 ± 1,96
Heptapteridae					
<i>Cetopsorhamdia iheringi</i> Schubart & Gomes, 1959	3	99,45 ± 0,23	0,83 ± 0,25	<i>Heptapterus</i> sp.*	17,65 ± 1,88
<i>Heptapterus</i> sp.*	1	98,98 ± 0	x	<i>H. multiradiatus</i> AC:GU701750	1,03 ± 0,41
<i>Pimelodella</i> sp.*	15	99,98 ± 0,01	0,02 ± 0,02	<i>Heptapterus</i> sp.*	17,22 ± 1,74
Loricariidae					
<i>Hypostomus regani</i> (Ihering, 1905)	1	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Hypostomus hermanni</i>	0,5 ± 0,28
<i>Hypostomus</i> sp1. *	1	98,97 ± 0	x	<i>Hypostomus hermanni</i>	1,22 ± 0,43
<i>Hypostomus</i> sp2. *	1	99,45 ± 0	x	<i>Hypostomus alatus</i> AC:HM405134	0,53 ± 0,29
<i>Loricariichthys platymetopon</i> Isbrücker & Nijssen, 1979	5	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Pterygoplichthys anisitsi</i>	16,78 ± 1,85
<i>Pterygoplichthys ambrosettii</i> (Holmberg, 1893)	1	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Hypostomus hermanni</i> AC:GU701702	6,63 ± 1,10
Pimelodidae					

Melhor Correspondência	N	BOLD ± EP	D ± EP	VP	DVP ± EP
<i>Iheringichthys labrosus</i> (Lütken, 1874)	52	99,95 ± 0,01	0,66 ± 0,14	<i>Pimelodus microstoma</i> MZUEL 10856	6,31 ± 1,01
<i>Megalonema platanum</i> (Günther, 1880) *	7	98,97 ± 0,02	0,04 ± 0,04	<i>Pimelodus microstoma</i> MZUEL 10856	16,24 ± 1,72
<i>Pimelodus maculatus</i> Lacepède, 1803	55	99,99 ± 0,00	0,12 ± 0,08	<i>Pimelodus microstoma</i> MZUEL 10856	6,31 ± 1,08
<i>Pimelodus microstoma</i> Steindachner, 1877 *	193	97,3 ± 0,00	0,16 ± 0,04	<i>Pimelodus maculatus</i>	6,31 ± 1,08
<i>Pimelodus</i> sp. *	87	94,96 ± 0,00	0,07 ± 0,05	<i>Pimelodus ornatus</i> AC:ITAPE065-15	5,38 ± 0,92
<i>Pinirampus pirinampu</i> (Spix & Agassiz, 1829)	10	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Pimelodus ornatus</i> AC:ITAPE065-15	18,80 ± 1,91
Total	961				

210

211

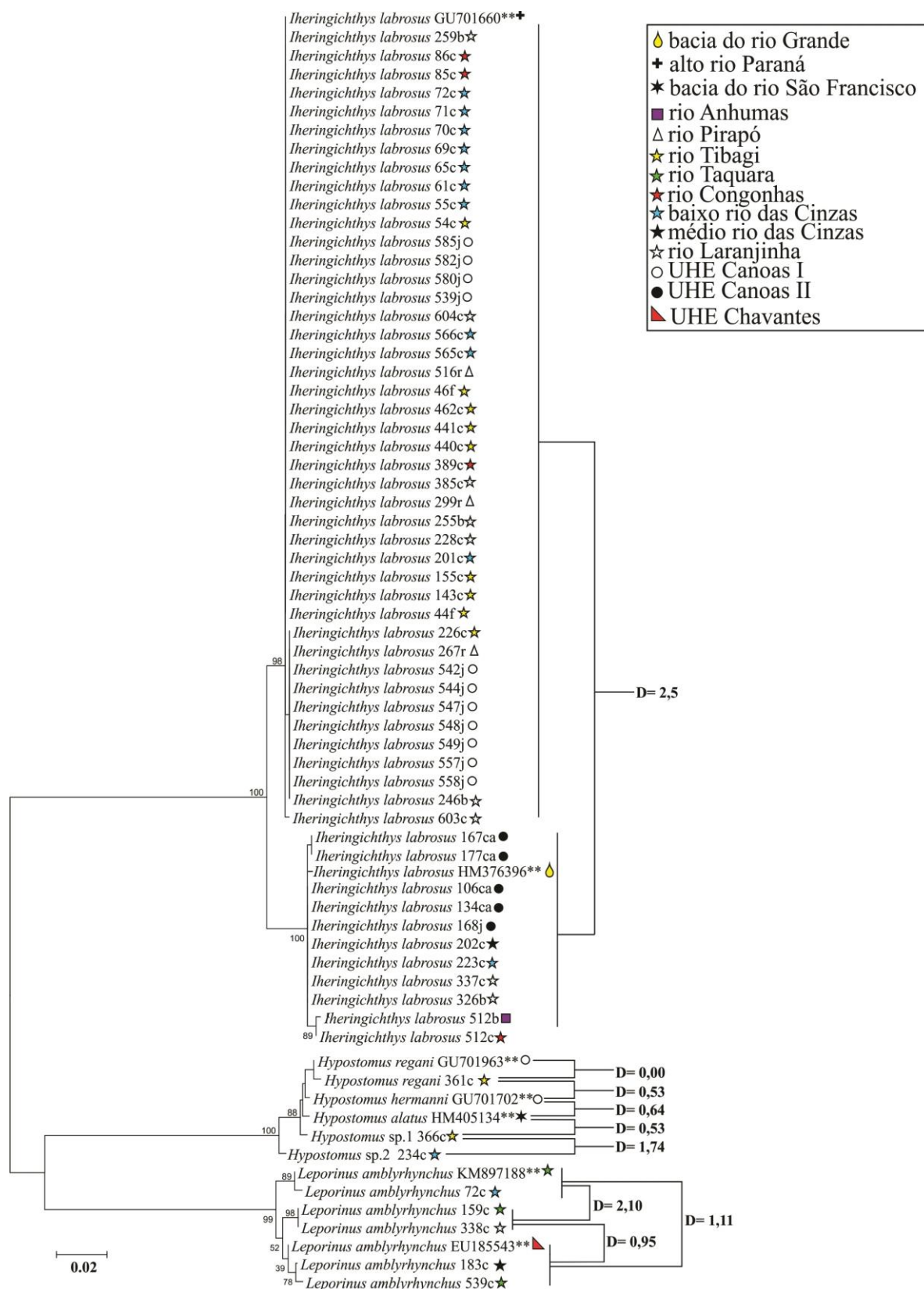
212 A identificação de duas espécies ainda não presentes no banco de dados foi realizada a
 213 partir da correspondência inicial para os gêneros *Pimelodus* e *Megalonema*.
 214 Consecutivamente, amostras de exemplares adultos de *Megalonema platanum* e *Pimelodus*
 215 *microstoma*, taxonomicamente identificadas, tiveram o DNA total extraído, sequências COI
 216 amplificadas e sequenciadas. Foram incorporadas nas análises de distância K2P
 217 representantes de todas as espécies do gênero *Pimelodus* presentes no Boldsystems,
 218 juntamente com as sequências de indivíduos adultos de *Pimelodus microstoma* e *Megalonema*
 219 *platanum* e as sequências obtidas a partir de ovos e larvas. Deste modo pode-se confirmar o
 220 status das amostras a nível específico (Fig. 4).



221 **Figura 4.** Dendrograma demonstrando *clusters* formados por sequências de espécies não presentes no banco de
 222 dados e sequências com gêneros previamente identificados. Distância genética estimada com base no modelo
 223 Kimura-2-Parâmetros e relacionada pelo método de Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através do
 224 software MEGA v 6.0. Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada
 225 bifurcação, tendo valores inferiores a 70% ocultados. * Sequências para comparação de espécies não depositadas
 226 no banco de dados seguidas do número de tombo (MZUEL: coleção ictiológica do Museu de Zoologia da
 227 Universidade Estadual de Londrina); **Sequências retiradas do banco de dados Boldsystems® seguidas de seu
 228 código de acesso; Entre parênteses número de indivíduos incluídos nas análises; Representantes de todas as
 229 espécies do gênero *Pimelodus* presentes no banco de dados foram incorporadas na análise.

231

232 Alguns dos espécimes identificados a nível específico, com correspondência superior a
233 99% aos exemplares depositados no banco de dados, apresentaram um comportamento
234 peculiar quando dispostos em dendrograma: *Iheringichthys labrosus* e *Leporinus*
235 *amblyrhynchus*, e se subdividiram em dois *clusters* mostrando uma profunda divergência
236 intraespecífica ($\geq 2\%$). De modo oposto, espécies pertencentes ao gênero *Hypostomus*
237 apresentaram entre si uma baixa divergência interespecífica ($\leq 2\%$) (Fig. 5).



238

239 **Figura 5.** Dendrograma demonstrando espécies com profunda distância intraespecífica e espécies com baixa
 240 distância interespecífica. Distância genética foi estimada com base no modelo Kimura-2-Parâmetros e
 241 relacionada pelo método de Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através do software MEGA v 6.0.
 242 Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada bifurcação. **Sequências
 243 retiradas do banco de dados Boldsystems® seguidas de seu código de acesso; Ao lado de cada sequência
 244 representado o local de origem do espécime; **D:** Distância genética K2P (%).

245 Todos os fragmentos analisados tiveram em média 600pb com boa qualidade, sem
 246 evidências de inserções, deleções ou códons de parada. As distâncias baseadas em K2P
 247 mostraram um aumento proporcional de valores de acordo com o aumento do nível
 248 taxonômico analisado. Para comparações intraespecíficas os valores variaram de 0 a 1,94%
 249 (média 0,21%); interespecíficas de 1 a 7,33% (média 3,61%) e dentro de famílias de 8,47 a
 250 18,48% (média 11,82%) (Tabela 2).

251
 252 **Tabela 2.** Resumo da distribuição de frequência relativa das distâncias genéticas K2P intraespecíficas e
 253 interespecíficas. Conjunto de dados utilizados englobam apenas sequências de espécimes identificados. Não
 254 foram considerados nos cálculos de comparação os grupos com apenas um representante para o grupo. Valores
 255 (%).

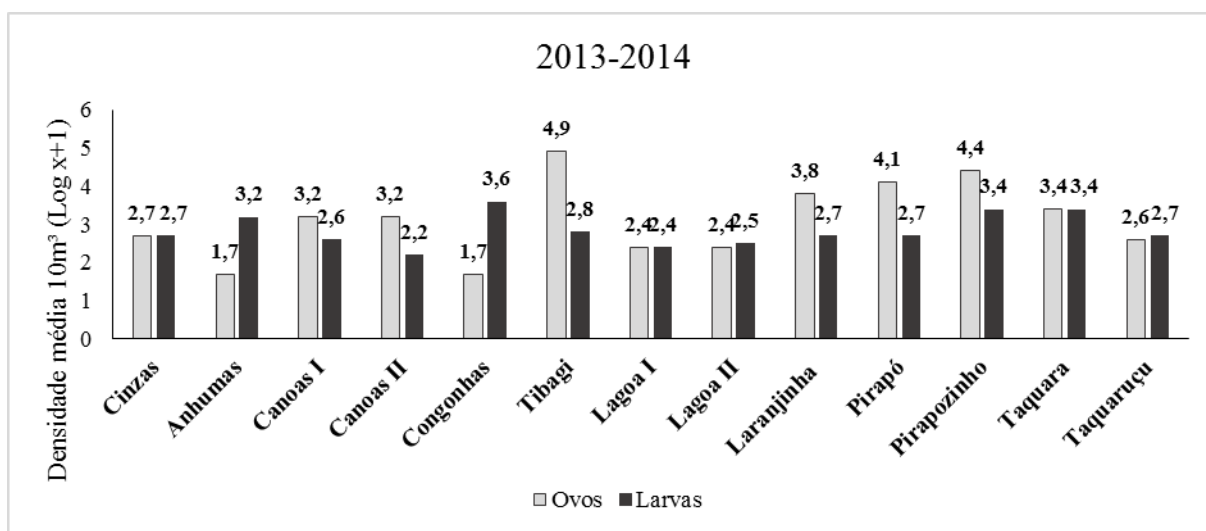
Distâncias Genéticas					
Comparações dentro de	Táxons	Mínima	Média	Máxima	Erro Padrão
Espécie	53	0	0,21	1,94	0,05
Gênero, entre espécies	7	1	3,61	7,33	0,92
Família, entre Gêneros	4	8,47	11,82	18,48	1,30
Ordem, entre Famílias	3	12,70	17,36	23,45	3,18

256

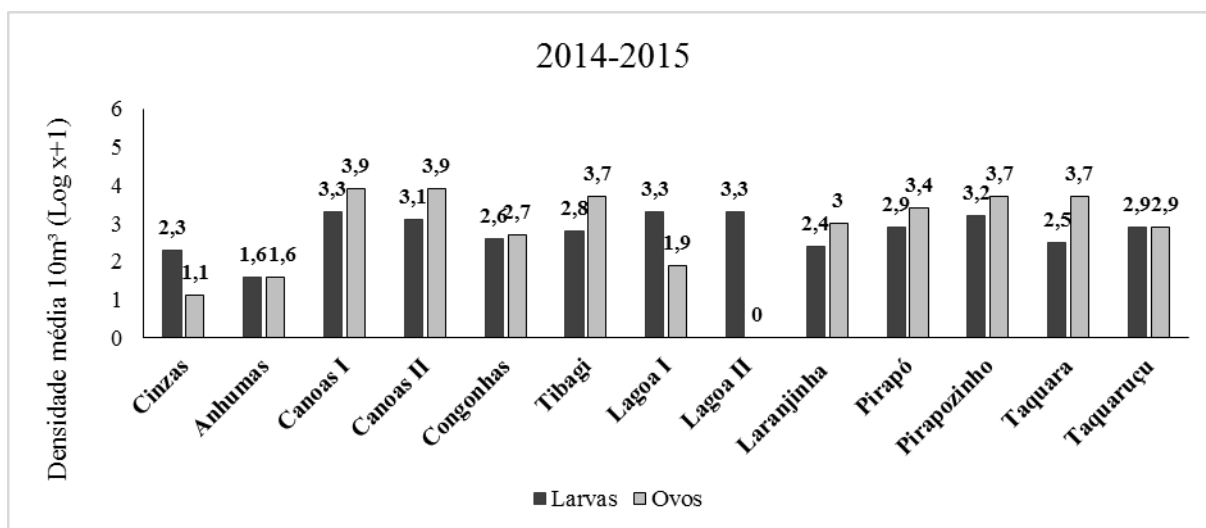
257 *Abundância e composição taxonômica de ovos e larvas amostrados*

258 Todos os dados foram transformados em $\log x+1$ para alcançar os pressupostos de
 259 normalidade e homocedasticidade da variância (Peters 1986). Em relação à densidade de ovos
 260 coletados, apresentaram as maiores e menores densidades respectivamente: durante o primeiro
 261 período amostrado, rio Tibagi (4,9 ovos/10m³) e o rio Congonhas e Anhumas (1,7
 262 ovos/10m³); para o segundo período, Canoas I e Lagoa I (3,3 ovos/10m³) e Lagoa II (não
 263 houveram capturas de ovos) (Figs. 6 e 7).

264 Quanto as larvas apresentaram as maiores e menores densidades de captura
 265 respectivamente: durante o primeiro período amostrado o rio Congonhas (3,6 larvas/10m³) e
 266 Canoas II (2,2 larvas/10m³); e para o segundo período, Canoas I e Lagoas II (3,3 larvas/10m³)
 267 e Anhumas (1,6/10m³) (Figs. 6 e 7).



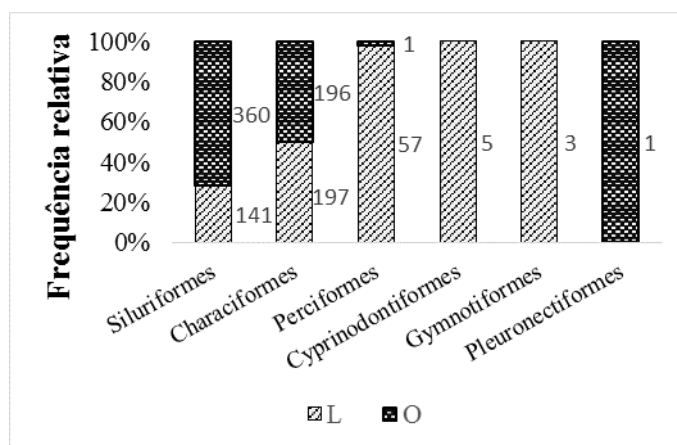
268
269 **Figura 6.** Densidade média de capturas. Referente ao primeiro período amostrado (setembro de 2013 – março
270 de 2014). Médio-Baixo rio Paranapanema.
271



272
273 **Figura 7.** Densidade média de capturas. Referente ao segundo período amostrado (setembro de 2014 – março de
274 2015). Médio-Baixo rio Paranapanema.
275

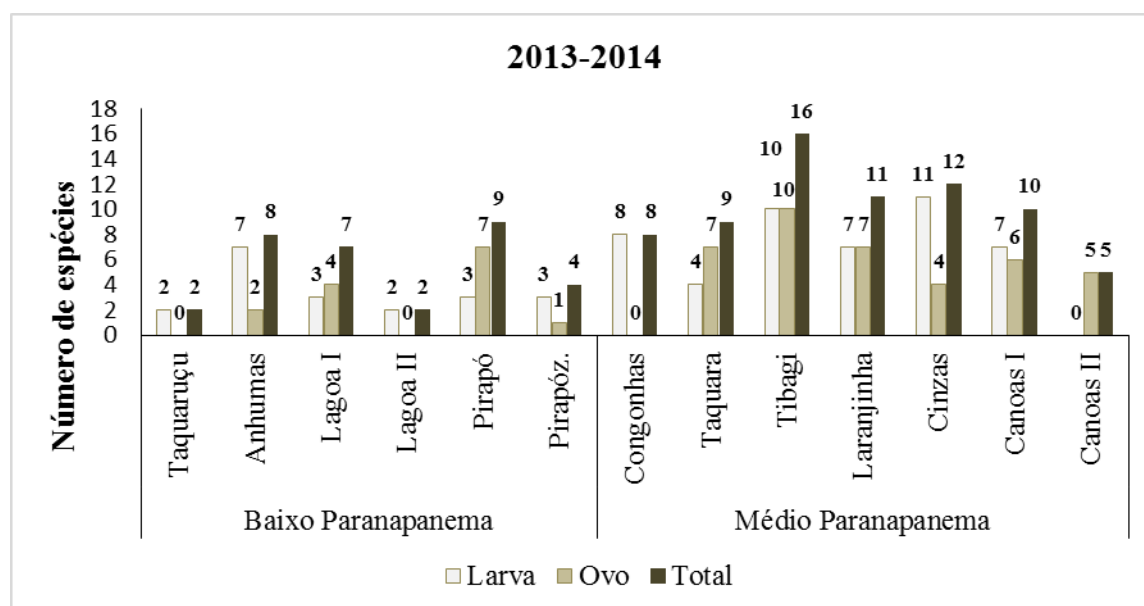
276
277 As ordens com maior abundância foram os Siluriformes (52,1%) e Characiformes
278 (40,8%) seguidas dos Perciformes (6%), Cyprinodontiformes (0,5%), Gymnotiformes (0,3%)
279 e Pleuronectiformes (0,1%). Estando os Cyprinodontiformes e Gymnotiformes apenas entre
280 larvas, Pleuronectiformes apenas entre os ovos, Perciformes dominantes no estágio larval e
281 Siluriformes e Characiformes dominante entre os ovos (Fig. 8).

282



283
284 **Figura 8.** Frequências relativa e absoluta por ordem. Referente a setembro de 2013 a março de 2015. Estágio de
285 vida: L (Larva); O (Ovo).
286

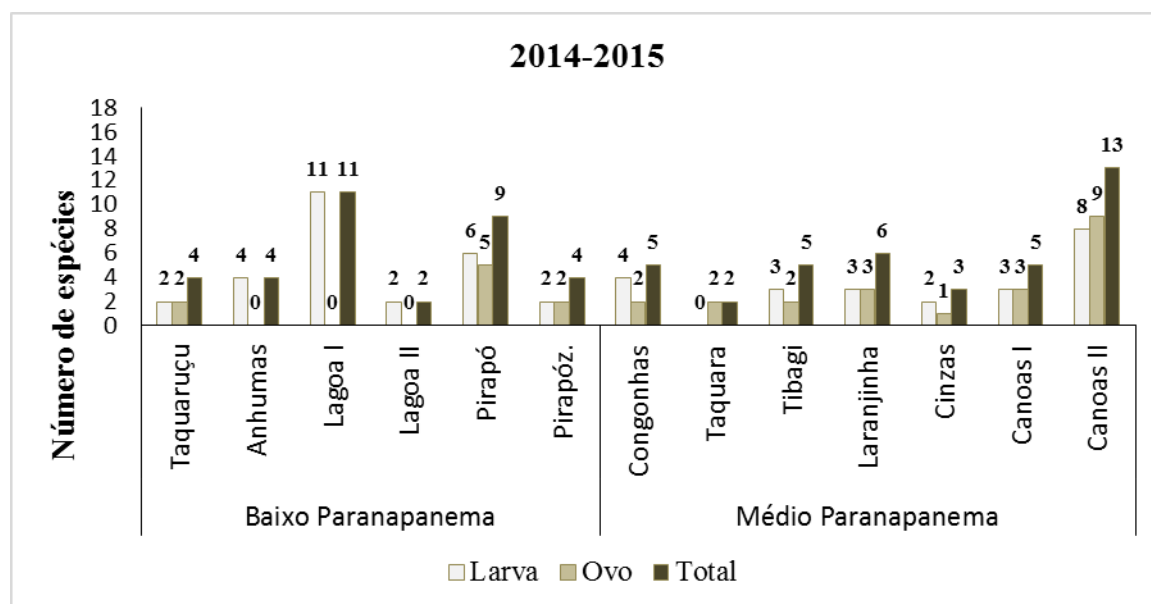
287
288 Em relação ao primeiro período amostrado, foi observado um total de 42 espécies
289 (Informação suporte: Tabela 1). A calha principal do rio Tibagi, destacou-se por apresentar o
290 maior número de espécies (16) (Fig. 9), destas foram as mais abundantes *Pimelodus* sp. (53),
291 *Pimelodus maculatus* (27), *Leporinus friderici* (19), *Pimelodus microstoma* (11) e *Pirinampus*
292 *pirinampu* (8), respectivamente (Informação suporte: Tabela 2).
293
294



295
296 **Figura 9.** Número de espécies por ponto. Referente ao primeiro período de amostragem (setembro de 2013 –
297 março de 2014). Baixo e médio rio Paranapanema. Estágio de vida: L (Larva); O (Ovo).
298
299

300 Durante o segundo período amostrado foram encontradas um total 34 espécies
 301 (Informação suporte: Tabela 1). O ponto amostrado com maior riqueza de espécies foi o
 302 reservatório de Canoas II (13) (Fig. 10), encontradas em maior abundância *Plagioscion*
 303 *squamosissimus* (23), *Pimelodus maculatus* (15), *Leporinus octofasciatus* (14) e *Leporinus*
 304 *friderici* (13) (Informação suporte: Tabela 2).

305



306

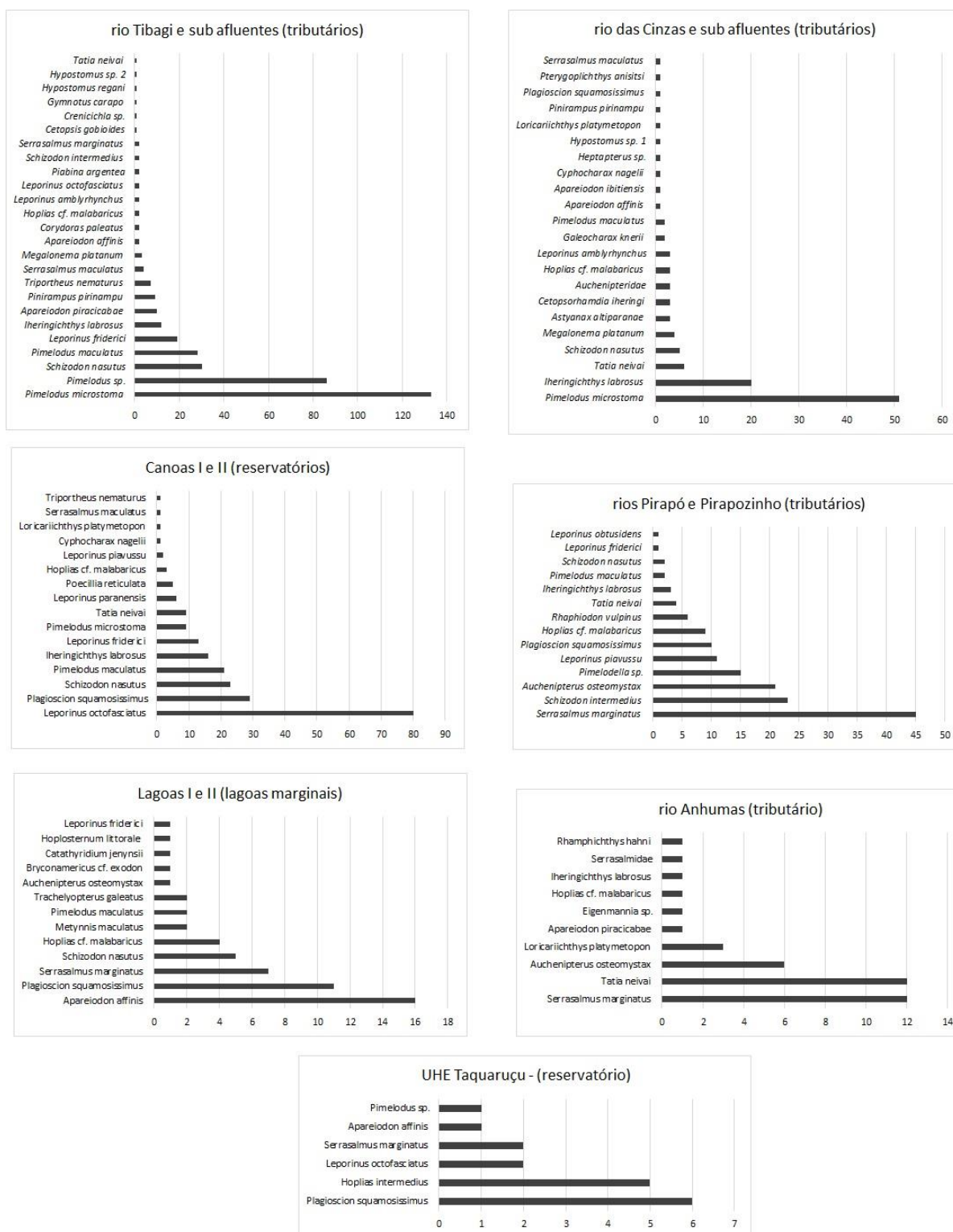
307 **Figura 10.** Número de espécies por ponto. Referente ao segundo período de amostragem (setembro de 2014 –
 308 março de 2015). Baixo e médio rio Paranapanema. Estágio de vida: L (Larva); O (Ovo).

309

310

311 De modo geral houve uma queda na densidade de ovos e larvas coletados para o
 312 segundo período em relação ao primeiro período amostrado (Figs. 6 e 7), bem como uma
 313 queda de 15% em relação a riqueza de espécies (Figs. 9 e 10).

314 Quando comparados tributários, sub-afluentes, lagoas e reservatórios, a maior
 315 diversidade foi encontrada para o rio Tibagi e sub-afluentes (25) e rio das Cinzas e sub-
 316 afluentes (22), seguidos dos reservatórios das UHEs Canoas I e II (16), dos pequenos
 317 tributários Pirapó e Pirapozinho (14) e suas lagoas marginais (13), e com as menores
 318 diversidades para o tributário Anhumas (10) e o reservatório da UHE Taquaruçu (6) (Figura
 319 11).



320 **Figura 11.** Espécies encontradas por tributários, sub-afluentes, lagoas marginais e reservatórios.
 321
 322

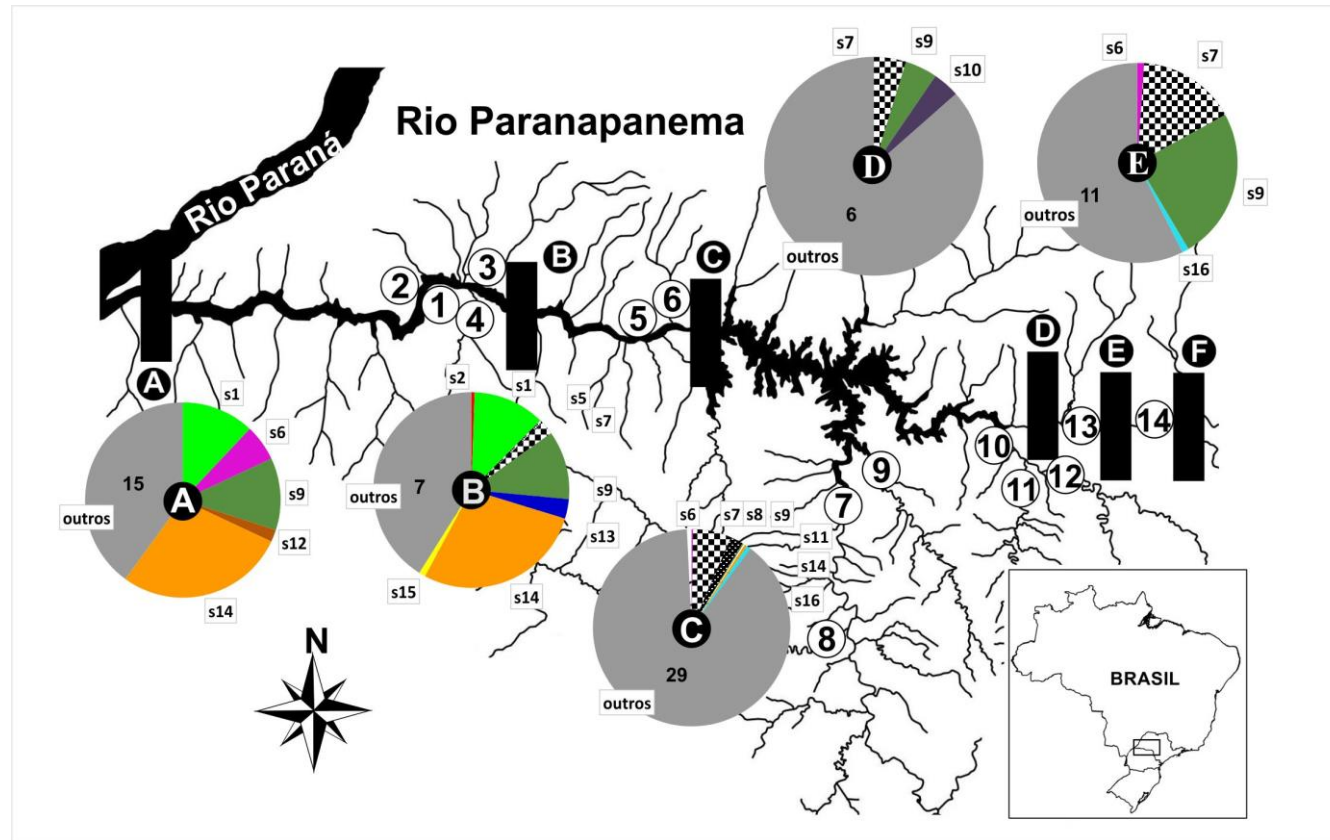
323

324 Das 43 espécies bem definidas (similaridade >99%), dez não são nativas para a
 325 planície de inundação do alto rio Paraná, de ocorrência tanto por introdução: *Plagioscion*

326 *squamosissimus* (Da Graça & Pavanelli 2007) e *Poecillia reticulata* (Langeani *et al.* 2007);
327 como por invasão após a construção do reservatório de Itaipu: *Serrasalmus marginatus*
328 (Alexandre *et al.* 2008), *Pterygoplichthys anisitsi*, *Rhaphiodon vulpinus* (Da Graça &
329 Pavanelli 2007), *Catathyridium jenynsii*, *Loricariichthys platymetopon*, *Triportheus*
330 *nematurus*, *Rhamphichthys hahni* (Langeani *et al.* 2007), *Trachelyopterus galeatus* e
331 *Auchenipterus osteomystax* (Júlio Jr *et al.* 2009). Entre elas, foram as mais abundantes
332 *Serrasalmus marginatus* (65), *Plagioscion squamosissimus* (56) e *Auchenipterus osteomystax*
333 (27), predominantes no estágio larval (Informação suporte: Tabelas 2 e 3).

334 Todos os pontos amostrados tiveram a ocorrência de espécies exóticas, porém as
335 maiores proporções foram encontradas para Rosana e Taquaruçu. Em contrapartida, as áreas
336 de influência do reservatório Capivara, apresentaram um número maior de capturas de
337 espécies nativas e migradoras de longa distância, em relação a espécies invasoras (Fig. 12).

338



339

340

341

342

343

344

345

Figura 12. Mapa com distribuição de espécies não nativas e espécies nativas migradoras de longa distância, para o alto rio Paraná, em zonas de influência dos reservatórios estudados. Cores sólidas: espécies invasoras (Da Graça & Pavanelli 2007; Langeani *et al.* 2007; Alexandre *et al.* 2008; Júlio Jr. *et al.* 2009); Padrão: Migradoras de longa distância (Agostinho *et al.* 2003); Cinza: demais espécies identificadas (1) Lagoa 2, (2) Lagoa 1, (3) rio Pirapózinho, (4) rio Pirapó (5) Anhumas, (6) reservatório Taquaruçu; (7) Tibagi, (8) rio Taquara, (9) rio Congonhas, (10) baixo Cinzas, (11) rio Laranjinha, (12) médio Cinzas; (13) UHE Canoas I, (14) UHE Canoas II; (A) UHE Rosana; (B) UHE Taquaruçu; (C) UHE Capivara; (D) UHE Canoa I; (E) UHE Canoas II; (F) UHE Salto Grande.

346 **Discussão**

347 *Resolução do status taxonômico do ictioplâncton do médio-baixo Paranapanema*

348 A identificação molecular através do DNA *barcoding* possibilitou a resolução ao nível
349 de espécie da maioria das amostras analisadas (85%). O valor de corte assumido foi a base na
350 determinação a nível de espécie, considerando apenas divergências abaixo de 1%, ou seja,
351 uma similaridade superior a 99% para sequências presentes no banco de dados. No entanto,
352 apesar de seguir critérios determinados *a priori*, sequências de *Iheringichthys labrosus* e
353 *Leporinus amblyrhynchus* apresentaram a melhor correspondência para espécimes distintos
354 do Boldsystems (Fig. 5), de forma que quando calculada a distância intraespecífica a
355 divergência máxima observada foi superior a 1% (Tabela 2).

356 De modo geral, a média da distância intraespecífica permaneceu abaixo de 2% e
357 aumentou progressivamente em relação ao nível taxonômico analisado, gênero, família e
358 ordem, respectivamente. Tais valores confirmam o que chamamos “*barcoding gaps*”, que são
359 as distâncias entre níveis taxonômicos distintos o suficiente para poder separá-los, ao passo
360 que a baixa distância intraespecífica define bem indivíduos pertencentes a mesma espécie
361 (Hebert *et al.* 2003; Candek & Kuntner 2015).

362 Recentemente, um estudo pioneiro em águas continentais da região Neotropical,
363 comprovou a eficiência do *DNA barcode* na discriminação das espécies de peixes para esta
364 região. Obtendo similaridade média de 99,25% entre as sequências COI de ovos e larvas de
365 peixes e sequências depositadas no banco de dados Boldsystems (Frantine-Silva *et al.* 2015),
366 conseguindo identificar quase 100% do ictioplâncton analisado. Podemos comparar nossos
367 resultados com os obtidos nesse estudo, uma vez que ambos tiveram a bacia do rio
368 Paranapanema como área de estudo. Cerca de metade das 37 espécies identificadas por

369 Frantine-Silva et al. (2015) foram também identificadas neste trabalho, além disso, pudemos
370 observar 36 outras espécies que não haviam sido amostradas.

371 As divergências de porcentagens no sucesso de identificação a nível específico
372 encontradas em ambos estudos (85% a quase 100%) devem provavelmente estar ligadas ao
373 surgimento relativamente recente da técnica *DNA Barcoding* e do “*Consortium for*
374 *the Barcode of Life*” (CBOL). Apesar dos esforços para obtenção de um banco de dados
375 completo, quando se trata da região Neotropical é normal que nem todas as espécies estejam
376 ainda devidamente validadas e depositadas, pois esta comporta uma ictiofauna muito rica e
377 diversificada (Reis *et al.* 2003).

378 Ainda assim, em grande parte dos casos onde a correspondência foi inespecífica, a
379 resolução se deu a nível de gênero (11%), o que é um passo muito importante, pois uma vez
380 sabendo a qual gênero o espécime pertence, é possível correlacionar sua sequência, através de
381 análises de distância, com sequências de espécies relatadas para a bacia e pertencentes ao
382 mesmo gênero. Tal como ocorrido no presente estudo, onde dois táxons puderam ser
383 resolvidos a nível de espécie: *Megalonema platanum* e *Pimelodus microstoma* (Fig. 4).
384 Ambos apresentaram correspondência para seus respectivos gêneros, porém as espécies ainda
385 não haviam sido incorporadas à base de dados Boldsystems.

386 A confirmação do *status* taxonômicos de ambas as espécies foi de extrema
387 importância uma vez que, *Pimelodus microstoma* representou cerca de 20% de todas as
388 amostras analisadas, em grande parte amostras de ovos, e esteve presente nas zonas de
389 influência da maioria dos reservatórios (Informação suporte: Tabelas 2 e 3). Já *Megalonema*
390 *platanum* é uma espécie para qual poucas informações sobre a biologia são relatadas
391 (Carvalho *et al.* 2011).

392 Em relação aos táxons com alta correspondência (>99%) para sequências
393 depositadas, *Iheringichthys labrosus* e *Leporinus amblyrhynchus* apresentaram alta
394 divergência intraespecífica ($\geq 2\%$) se subdividindo em dois *clusters* (Fig. 5). Realizando
395 estudo sobre a eficiência do *DNA barcoding* em espécies de peixes Neotropicais, Pereira et al.
396 (2013) encontrou também para algumas espécies uma profunda divergência intraespecífica. E
397 baseando-se na alta variabilidade cariotípica descrita na literatura para *Iheringichthys*
398 *labrosus* (Ribeiro et al. 2008) os autores indicaram a possível presença de mais de uma
399 unidade taxonômica, em casos de espécies crípticas a serem melhor estudadas.

400 O reconhecimento de espécies crípticas é um ponto inicial e fundamental para a
401 proteção adequada desses organismos, permitindo que a biodiversidade real não seja
402 subestimada e espécies raras sejam separadas de espécies comuns (Frankham et al. 2008). E
403 desde o seu surgimento o *DNA barcoding* tem contribuído de forma efetiva não só na
404 identificação de espécies crípticas de peixes (Hubert et al. 2008; Zang & Hanner 2011;
405 Khedkar et al. 2014), mas também de insetos (Hebert et al. 2004; Pfenninger et al. 2007),
406 crustáceos (Witt et al. 2006), algas (Saunders 2008), moluscos (Allcock et al. 2011), entre
407 outros.

408 Em contrapartida, os táxons pertencentes o gênero *Hypostomus* também apresentaram
409 uma baixa divergência interespecífica, com as espécies *Hypostomus regani*, *Hypostomus*
410 *hermanni* e *Hypostomus* sp2., tendo entre si distâncias K2P inferiores a 1% (Fig. 5). Há neste
411 caso de se levar em consideração que as taxas de mutação podem variar entre determinados
412 grupos (Herbert et al. 2003). Para algumas espécies pertencentes ao gênero *Hypostomus*
413 Pereira et al. (2013) encontrou igualmente baixa divergência, segundo os autores, táxons com
414 baixas divergências interespecíficas pode ser devido a eventos de radiação recente de um
415 mesmo gênero.

416 Apesar destes poucos casos, muitas outras espécies puderam ser identificadas a nível
417 específico com grande confiabilidade como, por exemplo, *Serrasalmus marginatus* e
418 *Serrasalmus maculatus*. Estas obtiveram uma correspondência superior a 99% para espécimes
419 depositados no banco de dados, e uma distância significativa entre si (5,47%) (Tabela 1). Tal
420 informação é de grande valia, pois uma vez no estágio larval ambas apresentam características
421 muito parecidas (Fig. 3), o que as torna difícil de separar apenas por caracteres morfológicos,
422 sendo na maioria das vezes classificadas até nível de gênero (Bialetzki *et al.*, 2005; de Lima *et*
423 *al.* 2013).

424 A espécie *Serrasalmus marginatus* que antes se encontrava confinada a jusante de Sete
425 Quedas, se estabeleceu no alto rio Paraná após o afogamento desta barreira natural pela
426 construção do reservatório de Itaipu (Da Graça & Pavanelli 2007). Agostinho & Júlio-Júnior,
427 (2002) realizaram amostragens nos anos subsequentes construção de Itaipu para *Serrasalmus*
428 *marginatus* e seu congênera nativo do alto rio Paraná *Serrasalmus maculatus*, e observaram
429 claramente um aumento nas capturas de *S. marginatus* em detrimento de *S. maculatus*.

430 O fato de que *Serrasalmus marginatus* consiga adaptar-se aos diversos ambientes,
431 aliado ao seu maior porte, podem ter possivelmente proporcionando vantagens durante o
432 processo de ocupação do rio Paraná e limitado o sucesso reprodutivo de *Serrasalmus*
433 *maculatus*, já que ambas competem pelos mesmos recursos (Alexandre *et al.* 2004). Portanto,
434 a identificação correta de ambas é fundamental, bem como a identificação de áreas onde
435 *Serrasalmus maculatus* esteja conseguindo se reproduzir.

436 Espécies pertencentes a família Anostomidae podem facilmente incorrer no mesmo
437 erro quanto a identificação por métodos taxonômicos tradicionais, devido a grande
438 similaridade morfológica em estágios larvais acabam muitas vezes sendo classificadas apenas
439 em nível de família (Bialetzki *et al.* 2005; Kipper *et al.* 2011) ou de gênero (da Silva *et al.*

440 2015). Oito espécies pertencentes à família Anostomidae foram identificadas com uma
441 correspondência alta para espécimes depositados no banco de dados (> 99%), dentre elas seis
442 pertencentes ao gênero *Leporinus*: *L. friderici*, *L. octofasciatus*, *L. obtusidens*, *L.*
443 *paranaenses*, *L. amblyrhynchus* e *L. piavussu*; e duas pertencentes ao gênero *Schizodon*: *S.*
444 *nasutus* e *S. intermedius* (Tabela 1).

445 Os resultados encontrados na identificação molecular do ictioplâncton garantiu que a
446 maior parte das amostras analisadas pudessem ser discriminadas a nível específico. A técnica
447 *DNA barcode* teve como grande diferencial a possibilidade de inclusão dos ovos às análises,
448 com estes representando 58% das amostras identificadas. A identificação a partir de caracteres
449 morfológicos por via de regra não inclui este estágio do desenvolvimento, justamente pela
450 impossibilidade de identificá-los, assim acabam sendo então incluídos apenas nas análises de
451 abundância para correlação com variáveis abióticas (Vianna & Nogueira 2008; Ziober *et al.*
452 2012).

453

454 *Variação espacial e temporal: densidade do ictioplâncton*

455 Quanto a densidade média de ovos e larvas capturadas, houve uma queda de (83%)
456 para o segundo período (2014-2015) em relação ao primeiro (2013-2014). Em bacias Sul-
457 Americanas, as forças seletivas que atuaram no desenvolvimento de estratégias reprodutivas
458 estão intimamente relacionadas ao regime das cheias, e estas, portanto, estão sincronizadas
459 com os principais eventos reprodutivos em peixes (Agostinho *et al.* 2000). Além disso, a
460 reprodução das espécies de peixes neotropicais é altamente sazonal, sendo os níveis
461 crescentes de água o gatilho para a desova (Vazzoler *et al.* 1996).

462 A queda na densidade do ictioplâncton capturado durante o segundo período
463 amostrado, pode estar relacionada a uma diminuição no volume de precipitações,

464 principalmente nos meses de outubro e novembro do ano 2014 para a região médio-baixa do
465 rio Paranapanema (Ministério de Minas e Energia- Boletim Mensal de Monitoramento do
466 Sistema Elétrico Brasileiro), meses importantes no início reprodutivo de muitas espécies da
467 bacia (Nakatani *et al.* 2001).

468 Análises de correlação entre ictioplâncton e variáveis limnológicas, realizadas por
469 Vianna & Nogueira *et al.* (2008) demonstram uma relação positiva entre condições mais
470 produtivas na reprodução dos peixes em águas altas, determinadas pelo incremento das
471 precipitações. De acordo com Godoy (1975), as cheias são um fator limitante para espécies
472 migradoras, pois dependem destas para a desova, ao passo que se durante o período
473 reprodutivo não houver cheias sua gônadas regridem e a desova não ocorre. Já espécies
474 sedentárias e migradoras de curta distância são menos dependentes deste fator (Agostinho *et*
475 *al.*, 2001).

476 A maior densidade de ovos para o rio Tibagi no primeiro período foi diretamente
477 proporcional ao número de espécies identificadas neste local (Figs. 6 e 7), apresentado uma
478 riqueza maior de espécies em relação aos demais pontos. Indicando que uma amostragem
479 mais ampla poderia provavelmente aumentar o número de espécies a serem reveladas tanto
480 para este como para os demais locais. Porém, poderíamos facilmente incorrer no erro de
481 dispender gastos e esforços para analisar os ovos provenientes de um único espécime com
482 comportamento reprodutivo de desova total.

483

484 *Variação temporal na composição do ictioplâncton*

485 Do total de 52 táxon amostrados 24 estiveram presentes para ambos períodos de
486 coleta. Sendo 18 espécies exclusivas para o primeiro período (2013-2014), dentre estas
487 espécies difíceis de serem amostradas entre o ictioplâncton como *Gymnotus carapo* (Vazzoler

488 1996) e *Hoplias intermedius* (Vasconcelos 2003), pois depositam seus ovos em ninhos e
489 cuidam da prole. Ciclídeos de modo geral também cuidam da prole de diversas maneiras (da
490 Graça & Pavanelli 2007), e o único representante para este grupo, *Crenicichla* sp. foi
491 identificado entre as larvas durante o primeiro período.

492 Entre as 10 espécies exclusivas para o segundo período (2014-2015), estiveram
493 *Rhamphichthys hahni* (Suzuki et al. 2004) e *Hoplosternum littorale* (Vazzoler 1996), ambas
494 espécies com hábitos de cuidado com a prole.

495 Além disso, a espécie reofílica *Apareiodon ibitiensis* (Vieira et al. 2015) e o migrador
496 de longa distância *Pinirampus pirinampu* (Agostinho et al. 2003) foram registrados apenas
497 durante o primeiro período de coletas. Enquanto *Rhaphiodon vulpinus*, também migrador de
498 longa distância (Agostinho et al. 2003), porém não nativo para a bacia do alto Paraná (da
499 Graça & Pavanelli 2007), foi exclusivo do segundo período de coleta.

500 Em análise do ictioplâncton do rio Paranapanema no período de amostragem que
501 compreendeu novembro de 2012 a março de 2013, Frantine-Silva et al. (2015) registrou 18
502 outras espécies não encontradas no presente estudo, entre estas estiveram migradores de longa
503 distância *Leporinus elongatus*, *Leporinus macrocephalus*, *Piaractus mesopotamicus*,
504 *Prochilodus lineatus*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Sorubim lima* (Agostinho et al. 2003) e
505 a também espécies ameaçadas como *Steindachneridion scriptum* (Agostinho et al. 2003;
506 Oyakawa & Menezes 2011).

507 Assim, as diferenças na composição de espécies registradas entre períodos distintos
508 demonstram a importância da abrangência dos períodos de coleta. Sendo que o registro de um
509 maior número de espécies só foi possível a partir da análise do ictioplâncton de ambos os
510 períodos, e muito provavelmente se as coletas tivessem se restringido a apenas um destes
511 muitas espécies não teriam sido amostradas.

512 *Variação espacial na composição do ictioplâncton*

513 As estratégias reprodutivas dos peixes Sul-Americanos podem se manifestar de
514 diversas maneiras (Vazzoler 1996). Tais táticas são responsáveis pelos padrões de distribuição
515 e abundância das espécies (Agostinho *et al.* 2007a), uma vez que cada espécie seleciona um
516 dado ambiente como local de desova baseado no conjunto de características abióticas para
517 quais suas estratégias reprodutivas estejam adaptadas (Baumgartner *et al.* 2008).

518 Foi claramente observada uma diferença na composição do ictioplâncton em diferentes
519 pontos da bacia sob a influência de reservatórios de cinco usinas hidrelétricas inseridas na
520 calha principal do rio Paranapanema (Fig. 12). As diferenças na composição das comunidades
521 de peixes nos diversos ambientes influenciados por barramentos se devem ao fato de que
522 grande parte das espécies de peixes sul-americanas carecem de adaptações para persistirem
523 em ambientes transformados por reservatórios (Agostinho *et al.* 2008).

524 As áreas de influência pelo reservatório da UHE Capivara consistiram em pontos
525 inseridos em dois principais tributários, o rio Tibagi e o rio das Cinzas, e quando comparados
526 aos demais exibiram uma riqueza maior de espécies (Fig. 11). Entre estas estiveram os
527 migradores de longa distância: *Pimelodus maculatus* e *Pinirampus pirinampu* (Agostinho *et*
528 *al.* 2003) e as espécies de curto deslocamento reprodutivo: *Apareiodon affinis* (Agostinho *et*
529 *al.* 2003), *Astyanax altiparanae* (Vazzoler 1996), *Galeocharax knerii* (Suzuki *et al.* 2004),
530 *Leporinus amblyrhynchus* (Suzuki *et al.* 2004) e *Leporinus frideci* (Agostinho *et al.* 2003). A
531 presença de espécies nativas migradoras e de curto deslocamento reprodutivo em afluentes do
532 reservatório indica que estas áreas são fundamentais para a manutenção da ictiofauna da bacia
533 do rio Paranapanema.

534 *Pinirampus pirinampu* é mais comumente encontrada na calha de rios de grande porte
535 do médio-baixo Paranapanema (Da Graça & Pavanelli 2007), e teve um declínio de suas

536 populações após o enchimento do reservatório de Rosana (Dias *et al.* 2004). Segundo Orsi
537 (2010), *P. pirinampu* provavelmente adotou o reservatório da UHE Capivara como local de
538 crescimento e alimentação, e ambientes lóticos de seus afluentes como áreas de desova e
539 berçário (Orsi 2010).

540 Foram observadas também larvas de duas espécies reofílicas, *Apareiodon ibitiensis* e
541 *Apareiodon piracicabae* (Vieira *et al.* 2015), no rio das Cinzas e em sub-afluentes do rio
542 Tibagi; e no maior e mais preservado tributário inserido no reservatório de Taquaruçu, o rio
543 Anhumas (Leme *et al.* 2015), sendo registrada *Apareiodon piracicabae*.

544 Após a formação de um reservatório, espécies reofílicas tendem a desaparecer
545 (Agostinho *et al.* 2007a), pois dependem de trechos lóticos para seu metabolismo geral,
546 sobretudo para a reprodução (Vieira *et al.* 2015). No entanto, apesar do ambiente lântico
547 formado logo a montante da barragem de Capivara, seus tributários o rio Tibagi e o rio das
548 Cinzas (Dias, 2003), têm sido apontados como remanescentes lóticos responsáveis pela
549 diversidade original da bacia, auxiliando na manutenção de populações reofílicas (Hoffman *et*
550 *al.* 2005; Shibatta *et al.* 2007; Vianna & Nogueira 2008).

551 Em termos de riqueza, espécies de peixes tendem a permanecer em ambientes que
552 preservem as características originais fluviais ou naqueles com grande heterogeneidade de
553 habitats, ou seja, tributários, lagoas marginais e presença de trechos lóticos (Agostinho *et al.*
554 2007a; Agostinho *et al.* 2007b). ORSI (2010) pode notar uma correlação positiva entre o
555 aumento do número de espécies de peixes em direção a trechos semi-lóticos e lóticos do
556 reservatório de Capivara, demonstrando a importância destes locais para a ictiofauna. Apesar
557 das zonas de influência do reservatório da UHE Capivara apresentarem tais características que
558 auxiliem na manutenção da diversidade local, este representa apenas um dos 11 reservatórios
559 dispostos ao longo do rio Paranapanema. Considerando o rio como um todo, a presença de

560 uma série de barramentos ao longo da calha principal tem, por sua vez, uma chance maior de
561 alterar ou eliminar habitats únicos das quais a ictiofauna local é dependente (Agostinho *et al.*
562 2007a). Espera-se assim, que em ambientes transformados por reservatórios, as espécies com
563 maior plasticidade estejam entre os colonizadores de maior sucesso (Agostinho *et al.* 1999).

564 Nos reservatórios das UHEs Canoas I e II pôde ser observado um grande número de
565 indivíduos da espécie exótica *Plagioscion squamosissimus* (Da Graça & Pavanelli 2007).
566 Espécie nativa da bacia Amazônica *P. squamosissimus* foi introduzida no rio Paraná devido a
567 sua importância para pesca comercial, se estabelecendo com sucesso em toda a bacia. Esta
568 espécie prefere águas lóxicas para a desova, mas teve sua estratégia reprodutiva altamente
569 adaptável a ambientes lênticos (Carnelós & Benedito Cecílio 2002) devido, principalmente,
570 ao período reprodutivo prolongado, desova parcelada, alta fertilidade e primeira maturação
571 gonadal já no primeiro ano de vida (Vazzoler, 1996; Bialetzki *et al.* 2004). Deste modo,
572 acabou se proliferando de forma eficaz em vários reservatórios da bacia do rio Paraná e seus
573 afluentes (Agostinho *et al.* 2007a).

574 A construção do complexo Canoas interrompeu o último trecho lótico livre de
575 barragens no trecho do médio rio Paranapanema (Vianna & Nogueira 2008). A presença
576 nestes locais, de larvas e ovos da espécie migradora de longa distância *Pimelodus maculatus*,
577 que preferencialmente desova em trechos lóticos, pode ser devido a exigências fisiológicas
578 menores para reprodução, além disso apresenta desova parcela, o que é incomum para peixes
579 migradores, garantindo o sucesso reprodutivo em vários tipos de ambientes (Agostinho *et al.*
580 2003).

581 Foram capturados também em Canoas I e II ovos de espécies com curto deslocamento
582 reprodutivo *Leporinus octofasciatus* (Duker energy 2008) e *Leporinus friderici* (Agostinho *et*
583 *al.* 2003), isto indica que estes reservatórios estão sendo utilizado como área de desova por

584 estas espécies (Ziober *et al.* 2012). Britto (2009) observou adultos destas duas espécies se
585 utilizando das escadas de transposição de Canoas I e II para migrar ascendentemente o rio.
586 Apesar de constatarmos a reprodução de *L. octofasciatus* e *L. friderici*, a partir do
587 ictioplâncton capturado, a sobrevivência de ovos e larvas e a chegada destes indivíduos até a
588 vida adulta requer condições ambientais das quais estes reservatórios não dispõem, pelo
589 contrário, são caracterizados pela ausência de tributários, baixa turbidez da água, ambientes
590 hipóxicos e ausência de lagoas marginais (Ramos *et al.* 2012; Britto & Carvalho 2013). Além
591 disso, uma vez que peixes migradores utilizam escadas de transposição para ter acesso ao
592 trecho superior, acabam não retornando a parte inferior e ficando confinados a montante, em
593 um ambiente transformado por características de reservatório (Agostinho *et al.* 2002;
594 Agostinho *et al.* 2011).

595 Espécies não nativas para o alto rio Paraná ocorreram em todos os locais, porém em
596 maior proporção para áreas de influência dos reservatórios de UHE Rosana e UHE Taquaruçu
597 (Fig. 12), com predominância de espécies que apresentam desova parcelada, *Auchenipterus*
598 *osteomystax*, *Serrasalmus marginatus* e *Plagioscion squamosissimus* (Vazzoler 1996).
599 Segundo Nikolski (1963) desova parcelada é uma característica comum de espécies que
600 vivem em ambientes lênticos, pela qual a espécie tem melhores chances de sobrevivência a
601 mudanças drásticas do ambiente, como as ocasionadas pela transformação de um rio em lago
602 artificial.

603 Esta predominância foi também encontrada entre espécimes adultos no reservatório de
604 Taquaruçu por Britto & Carvalho (2006), com maior abundância para *Serrasalmus*
605 *marginatus* e *Plagioscion squamosissimus*; e para o ictioplâncton do reservatório de Rosana
606 por Kipper *et al.* (2011), evidenciando em zonas limnéticas um grande número de capturas de
607 *Plagioscion squamosissimus*.

608 Além destas foram observadas para Rosana e Taquaruçu espécies que apresentam
609 cuidado com a prole e tem boa tolerância a ambientes hipóxicos como *Hoplosternum littorale*
610 (Luquete *et al.* 1990; Vazzoler 1996), *Hoplias cf. malabaricus* (Ballon 1985; Vazzoler 1996),
611 *Hoplias intermedius* (Balon 1985, Vasconcelos 2003) e *Loricarichthys platymetopon*
612 (Vazzoler 1996). O cuidado parental é comum para espécies que habitam ambientes com
613 pouco oxigênio, em que os ovos e larvas estão expostos a condições severas durante seu
614 crescimento (Cramptom, 2005).

615 A presença de *Apareiodon piracicabae* no tributário Anhumas demonstra sua
616 importância como remanescente lótico para manutenção da ictiofauna nativa, frente ao
617 ambiente transformado pelo reservatório de Taquaruçu, o qual apresentou um baixo número
618 de espécies (6). Bem como a importância dos tributários Pirapó e Pirapozinho, para o
619 reservatório de Rosana, onde foram encontradas as espécies migradoras de longa distância
620 *Leporinus obtusidens* (Suzuki *et al.* 2004) e *Rhaphiodon vulpinus* (de Lima *et al.* 2013), esta
621 última originária do baixo e médio rio Paraná, desovando em águas correntes (Agostinho *et*
622 *al.* 2003). Migradores têm necessidades biológicas muito restritas, acabando por não se
623 adaptar bem a ambientes transformados por barramentos (Godinho *et al.* 2010) e acabam
624 procurando os ambientes lóticos de seus afluentes como áreas de desova e berçário (Orsi
625 2010).

626 Considerando os reservatórios analisados Rosana é o segundo mais antigo, tendo o
627 eixo de sua barragem localizado a 20 km da foz, no rio Paraná (Júlio Júnior *et al.* 2005). Seus
628 dois principais tributários, o rio Pirapó e o rio Pirapózinho, sofrem constantes variações no
629 fluxo de água em curtos período de tempo, influenciadas pela sua localização logo a jusante
630 do reservatório de Taquaruçu (De Oliveira *et al.* 2009), além disso estudos reportam uma

631 diminuição na qualidade de suas águas pelo recebimento de afluentes contaminados pelo
632 despejo de lixo e esgotos clandestinos (Schneider *et al.* 2011; Costa *et al.* 2015).

633 A usina Taquaruçu, por sua vez, está localizada a 80 quilômetros de Capivara no
634 sentido da foz do Paranapanema, entre os municípios de Sandovalina (SP) e Itaguajé (PR). É
635 a segunda maior do rio em capacidade de geração de energia (Duke Energy 2008), porém, sua
636 área de bacia de drenagem é pequena, com alguns poucos afluentes, e seu corpo principal é
637 quase totalmente inserido na bacia de acumulação (Britto & Carvalho 2006).

638 A intensidade dos impactos causados por represamentos devem-se tanto as
639 características da biota pré-existente, quanto pelas características de cada reservatório e de sua
640 posição de inserção na bacia (Agostinho *et al.* 1999; Araújo & Santos 2001). Se tratando de
641 Rosana e Taquaruçu, a diminuição da variedade de habitats nesses ambientes causada pelo
642 represamento, aliadas a uma diminuição da qualidade da água dos tributários, ou a um
643 pequeno número destes, podem estar influenciando na composição do ictioplâncton
644 observado, quando comparados as áreas de influência dos demais reservatórios.

645 Alterações na composição das comunidades adultas de peixes, como a diminuição do
646 número de espécies nativas e aumento de espécies invasoras são esperadas após a construção
647 de reservatórios em sistema de cascata. Petesse e Petrere Jr (2012) estudando a comunidade
648 de peixes em reservatórios com sistema de cascata do rio Tiête, registraram, no ano de 1980,
649 61 espécies, das 80 originais para a bacia, e constataram uma grande homogeneidade na
650 composição de espécies entre os reservatórios, sendo mantidas por tributários menos
651 degradados e reservatórios jovens. No entanto, com a senescência dos reservatórios houve
652 uma drástica mudança, a partir de amostragens realizadas após 20 anos, eles puderam
653 observar um declínio de 50% no número de espécies nativas, as quais deram lugar a espécies
654 exóticas como *Plagioscion squamosissimus*.

655 Em relação ao rio Paranapanema, mudanças na composição da ictiofauna do
656 reservatório de Rosana foram registradas por Orsi e Britton (2014), que ao comparar
657 amostragens do ano de 2010 observaram que das 50 espécies nativas registradas a 20 anos
658 atrás (1990), 27 não estavam mais presentes. Além disto, registraram em 2010 a presença de
659 11 espécies não nativas para a bacia. Diversos estudos têm alertado para uma redução dos
660 grandes migradores da bacia do rio Paraná, tanto em razão dos impactos promovidos pela
661 regulação no regime das cheias, imposta por hidrelétricas (Agostinho & Zalewski 1996),
662 quanto pela interrupção de suas rotas migratórias (Agostinho *et al.* 2003; Agostinho *et al.*
663 2007b; Britto *et al.*, 2009). O que torna essencial a preservação dos afluentes e sub-afluentes
664 inseridos nos reservatórios ao longo da bacia do rio Paranapanema, uma vez que muitas
665 espécies de peixes têm se utilizados destes para a reprodução.

666

667 **CONCLUSÃO**

668 A compreensão de como as espécies de peixes estão organizadas ao longo de uma
669 bacia hidrográfica, bem como a avaliação do sucesso reprodutivo das comunidades ali
670 presentes é de extrema importância para sua conservação. Examinando as diferenças na
671 composição do ictioplâncton de locais sob influência de diferentes reservatórios, foi possível
672 observar claramente a importância dos pequenos e principalmente dos grandes tributários na
673 manutenção da diversidade das espécies de peixes. Concluimos então, que uma medida
674 primária para a preservação da biodiversidade na bacia é a manutenção dos trechos lóticos
675 livre de barramentos, pois estes têm fornecido condições para a reprodução de muitas
676 espécies, em especial espécies reofílicas e as que realizam movimentos migratórios durante o
677 período reprodutivo.

678 A utilização do *DNA barcoding* para análise dos produtos reprodutivos das espécies de
679 peixes da bacia do rio Paranapanema se mostrou de extrema eficiência, devido a possibilidade
680 de inclusão de ovos nas análises tornando os dados mais completos. Além disso, trabalhar
681 com diversidade a nível molecular destacou espécies que carecem de uma atenção maior
682 quanto ao seu potencial críptico, bem como aquelas candidatas a revisões taxonômicas.
683 Portanto, abordagens moleculares no estudo do ictioplâncton devem ser incluídas em futuras
684 propostas de estudos para uma maior abrangência em relação ao estágio de vida, e obtenção
685 de resultados mais precisos que possam ser utilizados em planos de conservação viáveis.

686 REFERÊNCIAS

- 687 Agostinho AA, Gomes LC, Fernandez DR, *et al.* (2002). Efficiency of fish ladders for
688 neotropical ichthyofauna. *River Research and Applications*, **18**, 299-306.
- 689
690 Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM. (2007a). *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros*
691 *em reservatórios do Brasil*. EDUEM, Maringá.
- 692
693 Agostinho AA, Gomes LC, Suzuki HI, Julio HF Jr (2003) Migratory fishes of the Upper
694 Paraná River Basin Brazil. In: *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and*
695 *Conservation Status* (eds. Carolsfeld J, Harvey B, Ross C & Baer A), p. 361. International
696 Development Research Centre, Ottawa, Ontario.
- 697
698 Agostinho AA, Júlio Junior RHF, Borghetti JR. (1992). Considerações Sobre os Impactos dos
699 Represamentos na Ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de Caso: Reservatório
700 de Itaipu. *Revista Unimar*, **14**, 90-107.
- 701
702 Agostinho AA, Miranda LE, Bini LM, *et al.* (1999). Patterns of colonization in neotropical
703 reservoirs, and prognoses on aging. In: *Theoretical reservoir ecology and its applications*.
704 (eds. Tundisi JG, Straskraba M), p. 227-265. Leiden: Backhuys Publishers, São Carlos, São
705 Paulo.
- 706
707 Agostinho AA, Pelicice FM, Gomes LC. (2008). Dams and the fish fauna of the Neotropical
708 region: impacts and management related to diversity and Fisheries. *Brazilian Journal of*
709 *Biology*, **68**, 1119-1132.
- 710
711 Agostinho AA, Pelicice FM, Petry AC, *et al.* (2007b). Fish diversity in the upper Paraná
712 River basin: habitats, fisheries, management and conservation. *Aquatic Ecosystem Health &*
713 *Management*, **10**, 174-186.
- 714

- 715 Agostinho AA, Thomaz SM, Minte-Vera CV, *et al.* (2000). Biodiversity in the high Paraná
716 River floodplain. *Biodiversity in wetlands: assessment, function and conservation*, **1**, 89-118.
717
- 718 Agostinho AA, Zalewski M. (1996). *A planície alagável do alto rio Paraná: importância e*
719 *preservação*. EDUEM, Maringá.
720
- 721 Agostinho CS, Pelicice FM, Marques EE, *et al.* (2011). All that goes up must come down?
722 Absence of downstream passage through a fish ladder in a large Amazonian
723 river. *Hydrobiologia*, **1**, 1-12.
724
- 725 Alexandre PC, Luiz EA, Piana PA, *et al.* (2008). Relação estoque-recrutamento para as
726 piranhas *Serrasalmus marginatus* (Valenciennes, 1847) e *S. maculatus* (Kner, 1860) no rio
727 Baía, alto rio Paraná. *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, **26**, 303-307.
728
- 729 Allcock AL, Barratt I, Eleaume M, *et al.* (2011). Cryptic speciation and the circumpolarity
730 debate: a case study on endemic Southern Ocean octopuses using the COI barcode of life.
731 *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **58**, 242-249.
732
- 733 Araújo FG, Santos LN. (2011). Distribution of fish assemblages in Lajes reservoir, Rio de
734 Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **61**, 563-576.
735
- 736 Balon EK. (1985). *Early life histories of fishes: new developmental, ecological and*
737 *evolutionary perspectives*. Dr W. Junk.
738
- 739 Baumgartner G, Nakatani K, Gomes LC, *et al.* (2008). Fish larvae from the upper Paraná
740 River: do abiotic factors affect larval density? *Neotropical Ichthyology*, **6**, 551-558.
741
- 742 Bialetzki A, Nakatani K, Sanches PV, *et al.* (2005). Larval fish assemblage in the Baía River
743 (Mato Grosso do Sul State, Brazil): temporal and spatial patterns. *Environmental Biology of*
744 *Fishes*, **73**, 37-47.
745
- 746 Britto SG de C. (2009). *A estratégia reprodutiva dos peixes migradores frente às escadas do*
747 *Complexo Canoas (Rio Paranapanema, Bacia do Alto Paraná*. Tese (Doutorado em Ciências
748 Biológicas). Unesp, Botucatu.
749
- 750 Britto SG, Carvalho ED. (2013). Reproductive migration of fish and movement in a series of
751 reservoirs in the Upper Parana River basin, Brazil. *Fisheries Management and Ecology*, **20**,
752 426-433.
753
- 754 Britto SGC, Carvalho ED. (2006) Ecological attributes of fish fauna in the Taquaruçu
755 reservoir, Paranapanema river (upper Paraná, Brazil): composition and spatial
756 distribution. *Acta Limnologica Brasiliense*, **18**, 377-388.
757
- 758 Candek K, Kuntner M. (2015). DNA barcoding gap: reliable species identification over
759 morphological and geographical scales. *Molecular ecology resources*, **15**, 268-277.
760

- 761 Carnelós RC, Benedito-Cecilio E. (2002). Reproductive strategies of *Plagioscion*
762 *squamosissimus* Heckel, 1840 (Osteichthyes Sciaenidae) in the Itaipu Reservoir,
763 Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **45**, 317-324.
764
- 765 Carvalho RAD, Sanchez S, Swarça AC, *et al.* (2011). Chromosomal analyses in *Megalonema*
766 *platanum* (Siluriformes: Pimelodidae), an endangered species from South American
767 rivers. *Neotropical Ichthyology*, **9**, 177-182.
768
- 769 Costa APD, Osco LP, Coladello R, *et al.* (2015). Avaliação do uso e ocupação na cabeceira
770 do rio pirapozinho (SP). *Colloquium Humanarum*, **11**, 58-65.
771
- 772 Crampton WGR, & Hopkins CD. (2005). Nesting and paternal care in the weakly electric fish
773 *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) with descriptions of larval and adult electric organ
774 discharges of two species. *Copeia*, **1**, 48-60.
775
- 776 Da Graça WJ, Pavanelli CS. (2007). *Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e*
777 *áreas adjacentes*. EDUEM: Maringá.
778
- 779 De Lima AF, Makrakis MC, da Silva PS, De Azevedo AV, Makrakis S De A, & Dias JHP.
780 (2013). Padrões de distribuição e ocorrência espaço-temporal de ovos e larvas de peixes nos
781 rios Pardo e Anhanduí, bacia do alto rio Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, **11**,
782 7-13.
- 783 De Oliveira Naliato DA, Nogueira MG, Perbiche-Neves G. (2009). Discharge pulses of
784 hydroelectric dams and their effects in the downstream limnological conditions: a case study
785 in a large tropical river (SE Brazil). *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, **144**, 301-
786 314.
787
- 788 Dias JH, Britto SGC, Vianna NC, *et al.* (2004). Biological and ecological aspects of
789 *Pinirampus pinirampu* (Spix, 1829), Siluriformes, Pimelodidae. Capivara reservoir,
790 Paranapanema River Southern Brazil. *Acta Limnologica Brasileira*, **16**, 293-304.
791
- 792 Dias JHP. (2003). *Distribuição espacial e temporal da ictiofauna do trecho médio do rio*
793 *Paranapanema e suas relações com as características morfológicas e limnológicas dos*
794 *compartimentos da bacia*. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). UFSCAR, São
795 Carlos.
796
- 797 Duke Energy. *Peixes do rio Paranapanema*. (2008). Editora Horizonte Geográfico, São
798 Paulo.
799
- 800 Eschmeyer WN, Fong JD. (1998). *Catalog of Fishes: Species of fishes MZ*. California
801 Academy of Sciences. Disponível em: [http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-](http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes)
802 [of-fishes](http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes).
803
- 804 Ewing B, Green P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error
805 probabilities. *Genome research*, **8**, 186-194.
806
- 807 Frankham R, Balou JD, Briscoe DA. (2008). *Fundamentos de Genética da Conservação*.
808 Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto.

- 809 Frantine-Silva W, Sofia SH, Orsi ML, *et al.* (2015). DNA barcoding of freshwater
810 ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular ecology*
811 *resources*, **15**, 1226-1237.
- 812
813 Garcia DAZ, Casimiro ACR, Orsi ML. (2012). Introduction of the armored catfish,
814 *Pterygoplichthys ambrosettii* (Holmberg, 1893), in a large effluent of the Upper Parana River
815 basin. *Journal of Applied Ichthyology*, **28**, 138-139.
- 816
817 Godinho AL, Lamas IR, Godinho HP. (2010). Reproductive ecology of Brazilian freshwater
818 fishes. *Environmental Biology of Fishes*, **87**, 143-162.
- 819
820 Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, *et al.* (2003). Biological identifications through DNA
821 barcodes. *Proceedings of the Real Society B*, **270**, 313-321.
- 822
823 Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, *et al.* (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals
824 cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the*
825 *National Academy of Sciences*, **101**, 14812-14817.
- 826
827 Hoffmann AC, Orsi ML, Shibatta OA. (2005). Diversidade de peixes do reservatório da UHE
828 Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná, Brasil,
829 e a importância dos grandes tributários na sua manutenção. *Iheringia, Série Zoologia*, **95**,
830 319-325.
- 831
832 Huang X, Madan A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research*,
833 **9**, 868-877.
- 834
835 Hubert N, Espiau B, Meyer C, *et al.* (2015). Identifying the ichthyoplankton of a coral reef
836 using DNA barcodes. *Molecular ecology resources*, **15**, 57-67.
- 837
838 Hubert N, Hanner R, Holm E, *et al.* (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through
839 DNA barcodes. *PLoS one*, **3**, 2490.
- 840
841 Júlio Junior HF, Thomaz SM, Agostinho AA, *et al.* (2005). Distribuição e caracterização dos
842 reservatórios. In *Biocenoses em Reservatórios (Padrões espaciais e temporais)*. (eds.
843 Rodrigues L, Thomaz SM, Agostinho AA, *et al.*), p. 1-16. Rima, São Carlos, São Paulos.
- 844
845 Júlio Júnior, Ferreira H, Tós CD, *et al.* (2009). A massive invasion of fish species after
846 eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology*, **7**, 709-
847 718.
- 848
849 Khedkar GD, Jamdade R, Naik S, *et al.* (2014). Barcodes for the Fishes of the Narmada, One
850 of India's Longest Rivers. *PloS one*, **9**, e101460.
- 851
852 Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions
853 through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, **16**,
854 111-120.
- 855

- 856 Kipper D, Bialezki A, Santin M. (2011). Composição Taxonômica da assembleia de larvas
857 de peixes no reservatório de Rosana, Rio Paranapanema, Brasil. *Biota Neotropica*, **11**, 421-
858 426.
- 859
860 Ko HL, Wang YT, Chiu TS, *et al.* (2013). Evaluating the accuracy of morphological
861 identification of larval fishes by applying DNA barcoding. *PloS one*, **8**, 53451.
- 862
863 Langeani F, Castro RMC, Oyakawa OT, *et al.* (2007). Diversidade da ictiofauna do Alto Rio
864 Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*, **5**, 75-78.
- 865
866 Leme GLA, Costa ADA, Garcia DAZ, *et al.* (2015). O potencial do rio Anhumas como um
867 dos principais afluentes do rio Paranapanema, no atual contexto de conservação de espécies
868 nativas. *Boletim sociedade brasileira de ictiologia*, **115**, 18-21.
- 869
870 Lowe-McConnell RH. (1999). *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Edusp:
871 São Paulo.
- 872
873 Luquet P, Boujard T, Planquette P, *et al.* (1989). The culture of *Hoplosternum littorale*: state
874 of the art and perspectives. *Advances in Tropical Aquaculture. Workshop at Tahiti, French*
875 *Polynesia*.
- 876
877 Morelli S, Vicari MR, Bertollo LAC. (2007). Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias*
878 *lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the others
879 Erythrinidae fish. *Brazilian Journal of Biology*, **67**, 897-903.
- 880
881 Nakatani K, Agostinho AA, Baumgartner G, *et al.* (2001). *Ovos e larvas de peixes de água*
882 *doce: desenvolvimento e manual de identificação*. EDUEM, Maringá.
- 883
884 Nakatani K, Baumgartner G, Cavicchioli M. (1997). Ecologia de ovos e larvas de peixes. In:
885 *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*.
886 (eds. Vazzoler, A. E. A. M.; Agostinho, A. A.; Hahn, N. S.), p. 281-306. EDUEM, Maringá,
887 Paraná.
- 888
889 Nakatani, K, Bialezki A, Santin M, *et al.* (2005). Ocorrência e abundância de larvas e juvenis
890 de peixes em reservatórios. In: *Biocenoses em reservatórios: padrões espaciais e temporais*.
891 (eds. Rodrigues L, Thomaz SM, Agostinho AA, *et al.*), p. 253-268. Rima, São Carlos, São
892 Paulo.
- 893
894 Orsi, M. L. (2010). *Estratégias reprodutivas de peixes: Estratégias reprodutivas de peixes da*
895 *região média-baixa do rio Paranapanema, reservatório de Capivara*. Blucher, São Paulo.
- 896
897 Orsi ML, Britton JR. (2014) Long-term changes in the fish assemblage of a neotropical
898 hydroelectric reservoir. *Journal of fish biology*, **6**, 1964-1970.
- 899
900 Oyakawa OT, Menezes NA (2011) Checklist dos peixes de água doce do Estado de São
901 Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, **11**, 19-31.
- 902

- 903 Pazian MF, Pereira LHG, Shimanukuro-Dias CK, et al. (2012). Cytogenetic and molecular
904 markers reveal the complexity of the *Piabina* genus Reinhardt, 1867 (Characiformes:
905 Characidae). *Genetic Molecular Biology*, **10**, 329-340.
- 906
- 907 Pegg, G. G.; Sinclair, B.; Briskey, L.; et al. (2006). MtDNA barcode identification of fish
908 larvae in the southern Great Barrier Reef. *Australia. Scientia Marina*, **70**, 7-12.
- 909
- 910 Pereira LH, Hanner R, Foresti F, et al. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate
911 megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC genetics*, **14**, 20.
- 912
- 913 Peters RK. (1986). The role of prediction in limnology. *Limnology and Oceanography*, **31**,
914 1143-1159.
- 915
- 916 Pfenninger MC, Nowak C, Kley D, et al. (2007). Utility of DNA taxonomy and barcoding for
917 the inference of larval community structure in morphologically cryptic Chironomus (Diptera)
918 species. *Molecular ecology*, **16**, 1957-1968.
- 919
- 920 Ramos JVB, Sodr e LMK, Orsi ML, et al. (2012). Genetic diversity of the species *Leporinus*
921 *elongates* (Teleostei: Characiformes) in the Canoas Complex - Paranapanema River.
922 *Neotropical Ichthyology*, **10**, 821-828.
- 923
- 924 Ratnasingham S, Heber PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System
925 (www.bacodingoflife.org). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 355–364.
- 926
- 927 Reis RE, Kullander SO, Ferrari CJJR. (2003). *Check list of the freshwater fishes of South and*
928 *Central America*. EDPUCRS: Porto Alegre.
- 929
- 930 Ribeiro LB, Matoso DA, Almeida MC, et al. (2008). Karyotypic variability in *Iheringichthys*
931 *labrosus* (Teleostei, Pimelodidae) from the Tibagi River basin (Paran a State, Brazil). *Genetic*
932 *Molecular Research*, **7**, 718-724.
- 933
- 934 Saunders G. W. A. (2008). DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae
935 in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose Dilsea-
936 Neodilsea complex and Weeksia. *Botany*, **86**, 773-789.
- 937
- 938 Schneider RM, Freire R, Cossich ES, et al. (2011). Estudo da influência do uso e ocupa o de
939 solo na qualidade da água de dois córregos da Bacia hidrográfica do rio Pirapó. *Acta*
940 *Scientiarum. Technology*, **33**, 295-303.
- 941
- 942 Shibatta AO, Gealh AM, Bennemann ST. (2007). Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia
943 do rio Tibagi, Paran a, Brasil. *Biota Neotropica*, **7**, 125-134.
- 944
- 945 Suzuki HI, Pelicice FM, Luiz EA, et al. (2002). Estratégias reprodutivas da assembléa de
946 peixes da planície de inunda o do alto rio Paraná. In: *A planície alagável do rio Paraná:*
947 *estrutura e processos ambientais*. (eds. Agostinho AA, Thomaz S, Nakatani K), p. 113-116.
948 Peld, Maringá, Paraná.
- 949

- 950 Suzuki HI, Vazzoler AEA de M, Marques EE, *et al.* (2004). Reproductive ecology of the fish
951 assemblage. In: *The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and*
952 *conservation*. (eds. Thomaz SM, Agostinho AA, Hahn NS), p. 271-292. Leiden, The
953 Netherlands, Backhuys Publishers, São Carlos, São Paulos.
- 954
- 955 Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics
956 Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729.
- 957
- 958 Togawa RC, Brígido MM. (2003). PHPH: Web based tool for simple electropherogram
959 quality analysis. In: *1 st International Conference on Bioinformatics and Computational*
960 *Biology-IcoBiCoBi*. *Ribeirão Preto*. Disponível em:
961 <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>.
- 962
- 963 Valdez-Moreno M, Vásquez-Yeomans L, Elías-Gutiérrez M, *et al.* (2010). Using DNA
964 barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Península,
965 Mexico: potential in fisheries management. *Marine and Freshwater Research*, **61**, 655-671.
- 966
- 967 Vazzoler AEAM. (1996). *Biologia reprodutiva de peixes teleósteos: Teoria e Prática*.
968 EDUEM, Maringá.
- 969
- 970 Vianna NC, Nogueira MG. (2008). Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas
971 River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin,
972 Brazil. *Acta Limnologica Brasiliense*, **20**, 139-151.
- 973
- 974 Vieira F, Gomes JPG, Maia P, Martins LG. (2015). *Peixes do quadrilátero ferrífero, guia de*
975 *identificação*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- 976
- 977 Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-
978 BOL. *Journal of Fish Biology*, **74**, 329-356.
- 979
- 980 Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, *et al.* (2005). Barcoding Australia's fish species.
981 *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**, 1847-1857.
- 982
- 983 Witt, J.; Threlhoff, D. S.; Doug, L.; *et al.* (2006). DNA barcoding reveals extraordinary cryptic
984 diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular*
985 *Ecology*, **15**, 3073-3082.
- 986
- 987 Zhang JB, Hanner R. (2011). DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine
988 fishes from Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, **39**, 31-42.
- 989
- 990 Ziober SR, Bialezki A, Mateus LA, de F. (2012). Effect of abiotic variables on fish eggs and
991 larvae distribution in headwaters of Cuiabá River, Mato Grosso State, Brazil. *Neotropical*
992 *Ichthyology*, **10**, 123-132.

Informação suporte

Tabela 1. Número de captura por espécie em cada período amostrado. **1º Período:** amostragem realizada entre setembro de 2013 a março de 2014. **2º Período:** Amostragem realizada entre setembro de 2014 a março de 2015.

Espécies	1º Período	2º Período
<i>Apareiodon affinis</i>	3	17
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	1	-
<i>Apareiodon piracicabae</i>	9	2
<i>Astyanax altiparanae</i>	3	-
<i>Auchenipterus osteomystax</i>	18	10
<i>Bryconamericus cf. exodon</i>	-	1
<i>Catathyridium jenynsii</i>	1	-
<i>Cetopsis gobioides</i>	-	1
<i>Cetopsorhamdia iheringi</i>	2	1
<i>Corydoras paleatus</i>	2	-
<i>Crenicichla sp.</i>	1	-
<i>Cyphocharax nagelii</i>	1	1
<i>Eigenmannia sp.</i>	1	-
<i>Galeocharax knerii</i>	2	-
<i>Auchenipteridae</i>	3	-
<i>Gymnotus carapo</i>	1	-
<i>Heptapterus sp.</i>	1	-
<i>Hoplias cf. malabaricus</i>	6	16
<i>Hoplias intermedius</i>	5	-
<i>Hoplosternum littorale</i>	-	1
<i>Hypostomus regani</i>	-	1
<i>Hypostomus sp1.</i>	1	-
<i>Hypostomus sp2.</i>	-	1
<i>Iheringichthys labrosus</i>	42	10
<i>Leporinus amblyrhynchus</i>	4	1
<i>Leporinus friderici</i>	21	13
<i>Leporinus obtusidens</i>	-	1
<i>Leporinus octofasciatus</i>	25	59
<i>Leporinus paranensis</i>	-	6
<i>Leporinus piavussu</i>	8	5
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	4	1
<i>Megalonema platanum</i>	7	-
<i>Metynnis maculatus</i>	1	1
<i>Serrasalminidae</i>	1	-
<i>Piabina argentea</i>	2	-
<i>Pimelodella sp.</i>	15	-
<i>Pimelodus maculatus</i>	37	18
<i>Pimelodus microstoma</i>	144	49

Continuação Tabela 1

Espécies	1º Período	2º Período
<i>Pimelodus</i> sp.	61	26
<i>Pinirampus pirinampu</i>	10	-
<i>Plagioscion squamosissimus</i>	19	38
<i>Poecillia reticulata</i>	3	2
<i>Pterygoplichthys anisitsi</i>	1	-
<i>Rhamphichthys hahni</i>	-	1
<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	-	6
<i>Schizodon intermedius</i>	13	12
<i>Schizodon nasutus</i>	38	27
<i>Serrasalmus maculatus</i>	3	3
<i>Serrasalmus marginatus</i>	50	18
<i>Tatia neivai</i>	16	16
<i>Trachelyopterus galeatus</i>	-	2
<i>Triportheus nematurus</i>	7	1
Total	42	34

Tabela 2. Tabela de distribuição de espécies ao longo do médio rio Paranapanema (setembro de 2013 à março de 2015). (A): Abundância absoluta é demonstrada para cada espécie, por ponto de coleta e estágio de vida (L) larva; (O) ovo; bem como a densidade média por 10m³ (número entre parênteses). BC: baixo Cinzas; MC: médio Cinzas; JZ: Jataizinho; LR: rio Laranjinha e TQ: Taquara.

‡ Migrador de longa distância (Agostinho *et al.* 2003).

† Espécie não nativa para o alto rio Paraná (Da Graça & Pavanelli 2007; Langeani *et al.* 2007; Júlio Júnior *et al.* 2009; Alexandre *et al.* 2008).

Espécies	UHE		UHE		UHE Capivara												
	A	Canoas I		Canoas II		B. C.		M. C.		CG		JZ		LR		TQ	
		L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
CHARACIFORMES																	
Anostomidae																	
<i>L. amblyrhynchus</i>	5	-	-	-	-	1 (1,8)	-	-	1 (3,5)	-	-	-	-	1 (2,7)	-	1 (1,9)	1 (1,9)
<i>L. friderici</i>	32	-	-	1 (1,6)	12 (19,5)	-	-	-	-	-	-	19 (66)	-	-	-	-	-
<i>L. octofasciatus</i>	82	2 (3,2)	64 (102,3)	-	14 (22,8)	-	-	-	-	-	-	1 (3,5)	1 (3,5)	-	-	-	-
<i>L. paranensis</i>	6	-	5 (8)	-	1 (1,6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. piavussu</i>	2	-	-	-	2 (3,2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (3,8)
<i>S. nasutus</i>	58	11 (17,6)	10 (16)	1 (1,6)	1 (1,6)	4 (7,2)	-	-	-	23 (125)	-	7 (24)	-	1 (2,7)	-	-	-
Characidae																	
<i>A. altiparanae</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 (8,2)	-	-	-
<i>C. nagelii</i>	2	-	-	-	1 (1,6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (2,7)	-	-
<i>G. knerii</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (2,7)	1 (2,7)	-	-
<i>P. argentea</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (3,5)	-	-	-	1 (1,9)	-
Erythrinidae																	
<i>H. cf. malabaricus</i>	8	1 (1,6)	1 (1,6)	1 (1,6)	-	2 (3,6)	-	-	-	2 (10,8)	-	-	-	1 (2,7)	-	-	-

Continuação Tabela 2

Espécies	A	UHE		UHE		UHE Capivara											
		Canoas I		Canoas II		B. C.		M. C.		CG		JZ		LR		TQ	
		L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
Parodontidae																	
<i>A. affinis</i>	3	-	-	-	-	-	1 (1,8)	-	-	-	-	-	2 (6,9)	-	-	-	-
<i>A. ibitiensis</i>	1	-	-	-	-	1 (1,8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. piracicabae</i>	10	-	-	-	-	-	-	-	-	8 (43,5)	-	-	-	-	-	2 (3,8)	-
Serrasalminidae																	
<i>S. maculatus</i>	6	-	-	1 (1,6)	-	-	-	-	-	3 (16,3)	1 (5,4)	-	-	-	1 (2,7)	-	-
<i>S. marginatus</i> †	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (6,9)	-	-	-	-	-
Triporthidae																	
<i>T. nematurus</i> †	8	-	-	1 (1,6)	-	-	-	-	-	1 (5,4)	-	1 (3,5)	5 (17,3)	-	-	-	-
CYPRINODONTIFORMES																	
Poeciliidae																	
<i>P. reticulata</i> †	5	5 (8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GYMNOTIFORMES																	
Gymnotidae																	
<i>G. carapo</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (5,4)	-	-	-	-	-	-	-
PERCIFORMES																	
Cichlidae																	
<i>Crenicichla</i> sp.*	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (3,5)	-	-	-	-	-
Sciaenidae																	
<i>P. squamosissimus</i> †	30	6 (9,6)	-	23 (37,4)	-	1 (1,8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SILURIFORMES																	
Auchenipteridae**	3	-	-	-	-	-	-	2 (6,9)	-	-	-	-	-	1 (2,7)	-	-	-

Continuação Tabela 2

Espécies	A	UHE		UHE		UHE Capivara											
		Canoas I		Canoas II		B. C.		M. C.		CG		JZ		LR		TQ	
		L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
<i>T. neivai</i>	16	-	-	9 (14,6)	-	2 (3,6)	-	3 (10,3)	-	-	-	1 (3,5)	-	1 (2,7)	-	-	-
Caliichthyidae																	
<i>C. paleatus</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (6,9)	-	-	-	-	-
Cetopsidae																	
<i>C. gobioides</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1,9)
Heptapteridae																	
<i>C. iheringi</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 (8,2)	-	-
<i>Heptapterus</i> sp.*	1	-	-	-	-	1 (1,8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Loricariidae																	
<i>H. regani</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (3,5)	-	-	-	-	-
<i>Hypostomus</i> sp1. *	1	-	-	-	-	-	-	1 (3,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hypostomus</i> sp2. *	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (3,5)	-	-	-	-	-
<i>L. platymetopon</i> †	2	-	-	-	1 (1,6)	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (2,7)	-	-	-
<i>P. ambrosettii</i> †	1	-	-	-	-	-	-	1 (3,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pimelodidae																	
<i>I. labrosus</i>	48	1 (1,6)	10 (16)	1 (1,6)	4 (6,5)	2 (3,6)	-	1 (3,5)	9 (31)	3 (16,3)	1 (5,4)	2 (6,9)	6 (20,8)	1 (2,7)	7 (19,3)	-	-
<i>M. platinum</i> *	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4 (11)	-	3 (5,7)
<i>P. maculatus</i>	51	2 (3,2)	4 (6,4)	9 (14,6)	6 (9,8)	-	2 (3,6)	-	-	-	-	-	27 (93,7)	-	-	-	1 (1,9)
<i>P. microstoma</i> *	193	1 (1,6)	3 (4,8)	-	5 (8,1)	4 (7,2)	-	11 (37,9)	6 (21)	2 (10,8)	-	5 (17)	6 (10,8)	2 (2,7)	28 (77,1)	13 (24,7)	107 (203,9)

Continuação Tabela 2

Espécies	A	UHE		UHE		UHE Capivara											
		Canoas I		Canoas II		B. C.		M. C.		CG		JZ		LR		TQ	
		L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
<i>Pimelodus</i> sp.*	86	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (5,4)	-	1 (3,5)	77 (267,3)	-	-	-	-
<i>P. pirinampu</i> ‡	10	-	-	-	-	1 (1,8)	-	-	-	-	-	-	8 (28)	-	-	-	1 (1,9)

Táxons em não puderam ser identificadas com base apenas no índice de similaridade BOLD, (*) correspondência < 99 %; (**) correspondência < 94 %. Em destaque amostra com correspondências múltiplas (>99 %).

Tabela 3. Tabela de distribuição de espécies ao longo do baixo rio Paranapanema (setembro de 2013 à março de 2015). (A): Abundância absoluta é demonstrada para cada espécie, por ponto de coleta e estágio de vida (L) larva; (O) ovo; bem como a densidade média por 10m³ (número entre parênteses). LI: Lagoa I, LII: Lagoa II, PP: Pirapó, PPZ: Pirapózinho, AN: Anhumas e TQC: Taquaruçu.

‡ Migrador de longa distância (Agostinho *et al.* 2003).

† Espécie não nativa da bacia (Da Graça & Pavanelli 2007; Langeani *et al.* 2007; Júlio Júnior *et al.* 2009; Alexandre *et al.* 2008).

Espécies	A	UHE Rosana						UHE Taquaruçu					
		LI		LII		PP		PPZ		AN		TQC	
		L	O	L	L	O	L	O	L	O	L	O	
CHARACIFORMES													
Anostomidae													
<i>Leporinus friderici</i>	2	-	1 (2,7)	-	-	1 (3,44)	-	-	-	-	-	-	
<i>Leporinus obtusidens</i> ‡	1	-	-	-	1 (3,44)	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Leporinus octofasciatus</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (6,8)	
<i>Leporinus piavussu</i>	11	-	-	-	-	11 (37,9)	-	-	-	-	-	-	
<i>Schizodon intermedius</i>	23	-	-	-	1 (3,4)	16 (55,2)	-	6 (27,2)	-	-	-	-	
<i>Schizodon nasutus</i>	7	3 (8,3)	-	2 (10,0)	2 (6,9)	-	-	-	-	-	-	-	
Characidae													
<i>Bryconamericus</i> cf. <i>exodon</i>	1	1 (2,7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cynodontidae													
<i>Rhaphiodon vulpinus</i> †	6	-	-	-	-	3 (10,3)	-	3 (13,6)	-	-	-	-	
Erythrinidae													

Continuação Tabela 3

Espécies	A	UHE Rosana								UHE Taquaruçu			
		LI		LII		PP		PPZ		AN		TQÇ	
		L	O	L	L	O	L	O	L	O	L	O	
<i>Pimelodella</i> sp.*	15	-	-	-	-	5 (17,2)	-	10 (45,4)	-	-	-	-	
Loricariidae													
<i>Loricariichthys platymetopon</i> †	3	-	-	-	-	-	-	-	2 (6,3)	1 (3,1)	-	-	
Pimelodidae													
<i>Iheringichthys labrosus</i>	4	-	-	-	-	3 (10,3)	-	-	1 (3,1)	-	-	-	
<i>Pimelodus maculatus</i> ‡	4	1 (2,7)	1 (2,7)	-	1 (3,44)	1 (3,44)	-	-	-	-	-	-	
<i>Pimelodus</i> sp.*	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (3,4)	

Táxons em não puderam ser identificadas com base apenas no índice de similaridade BOLD, (*) correspondência < 99 %; (**) correspondência < 94 %. Em destaque amostra com correspondências múltiplas (>99 %).

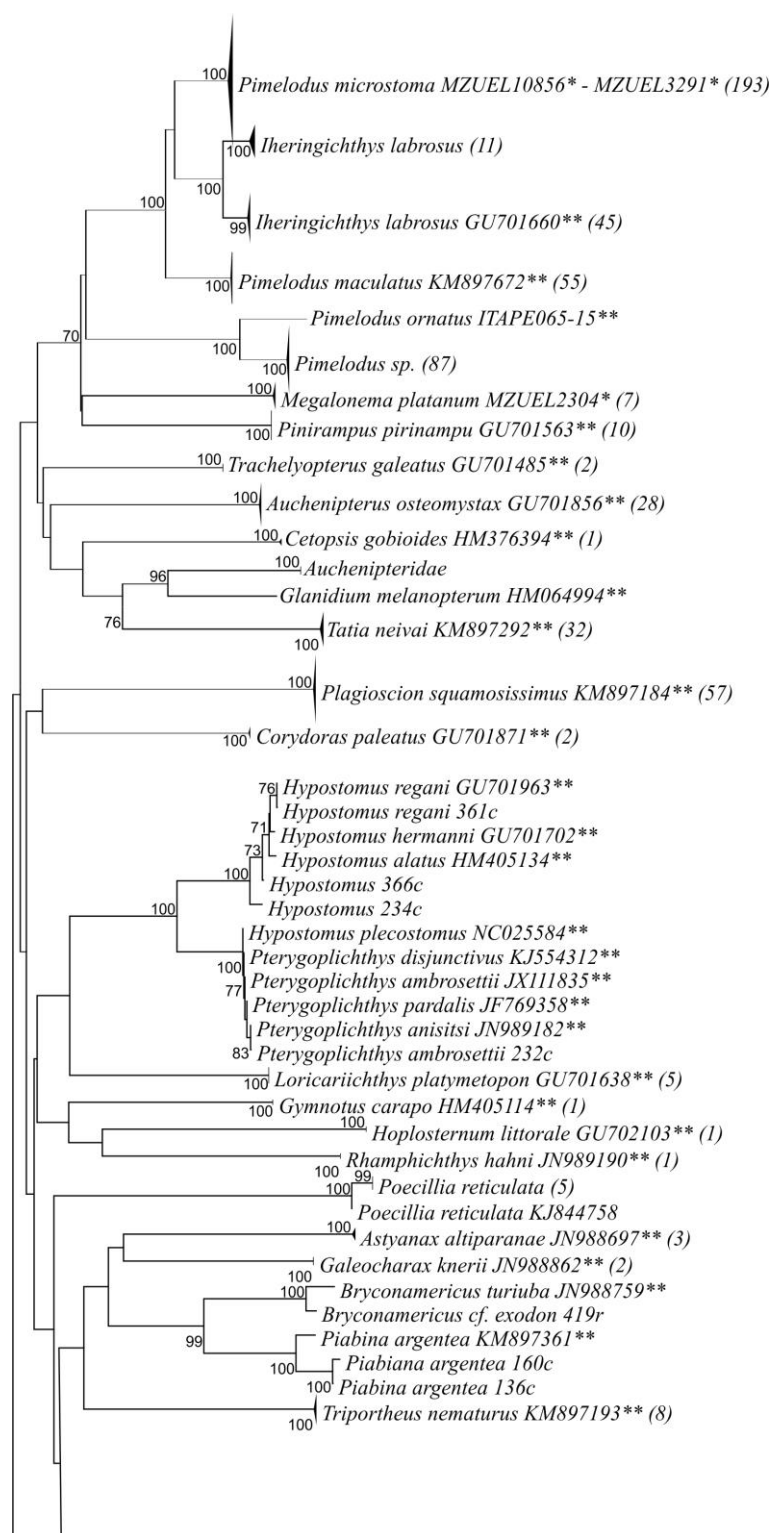


Figura 1. Dendrograma representando as distâncias genéticas das espécies encontradas. A distância genética Kimura-2-Parâmetros relacionada pelo método de Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através 5 do software MEGA v6.0. Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada bifurcação, valores inferiores a 70% foram ocultados. Os nomes dos grupos em itálico indicam a correspondência ao menor nível taxonômico possível, abundância absoluta indicada entre parênteses. (*) Espécies para as quais as sequências não estão depositadas no BOLD. (**) Sequências retiradas do BOLDsystems.

Continuação Figura 1

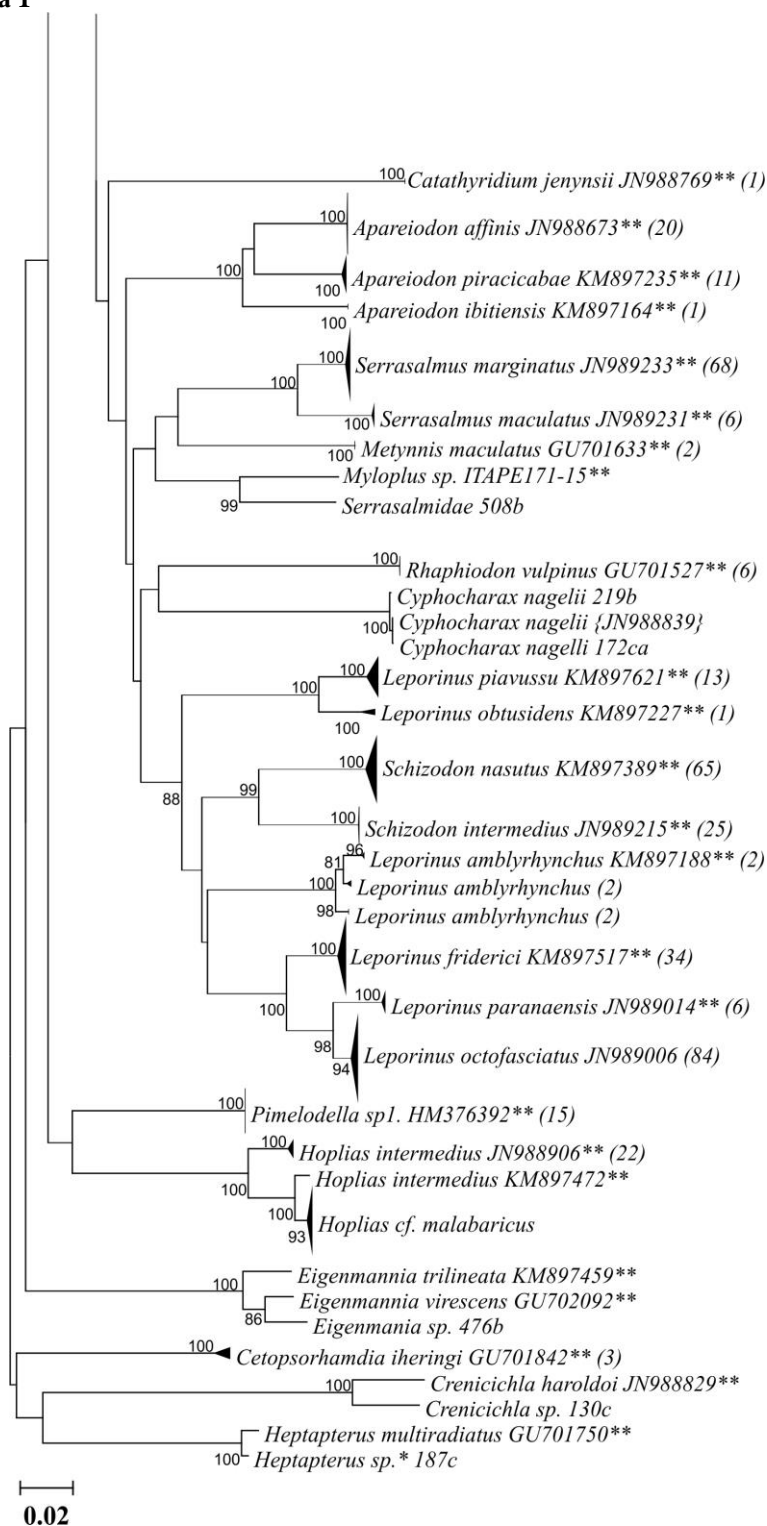


Figura 1. Dendrograma representando as distâncias genéticas das espécies encontradas. A distância genética Kimura-2-Parâmetros relacionada pelo método de Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através 5 do software MEGA v6.0. Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada bifurcação, valores inferiores a 70% foram ocultados. Os nomes dos grupos em *itálico* indicam a correspondência ao menor nível taxonômico possível, abundância absoluta indicada entre parênteses. (*) Espécies para as quais as sequências não estão depositadas no BOLD. (**) Sequências retiradas do Boldsystems

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABDEL-RAHMAN, S. M.; & AHMED, M. M. M. Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1246-1249, 2007.
- AGOSTINHO, A. A., THOMAZ, S. M., MINTE-VERA, C. V., & WINEMILLER, K. O. Biodiversity in the high Paraná River floodplain. **Biodiversity in wetlands: assessment, function and conservation**, v. 1, p. 89-118, 2000.
- AGOSTINHO, A. A.; & ZALEWSKI, M. **A planície alagável do alto rio Paraná: importância e preservação**. Maringá: EDUEM, 1996.
- AGOSTINHO, A. A.; CECÍLIO, B. **Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil**. Maringá: EDUEM, 1992.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; & PELICICE F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: EDUEM, p. 501, 2007.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; FERNANDEZ, D. R.; & SUZUKI, H. I. Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. **River Research and Applications**, v. 18, n. 3, p. 299-306, 2002.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SUZUKI, H. I.; & JÚLIO-JR, H. F. Migratory fishes of the Upper Paraná river basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J.; B; HARVEY, C; ROSS; & A. BAER (Eds). **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. Ottawa, International Development Research Centre/ World Bank, 2003. p. 19-98.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO J. R.; H. F.; & BORGHETTI, J. R. Considerações Sobre os Impactos dos Represamentos na Ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de Caso: Reservatório de Itaipu. **Revista Unimar**, v. 14, p. 90-107, 1992.
- AGOSTINHO, A. A.; L. C. GOMES; H. I. SUZUKI; & H. F. JÚLIO-JR. Migratory fishes of the Upper Paraná river basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J.; B; HARVEY, C; ROSS; & A. BAER (Eds). **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. Ottawa, International Development Research Centre/ World Bank, 2003. p. 19-98.
- AGOSTINHO, A. A.; MIRANDA, L. E.; BINI, L. M.; GOMES, L. C.; THOMAZ, S. M.; & SUZUKI, H. I. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: TUNDISI, J. G.; STRASKRABA, M. (eds.). **Theoretical reservoir ecology and its applications**. Leiden: Backhuys Publishers. p. 227-265, 1999.
- AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; & GOMES, L. C. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and Fisheries. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 1119-1132, 2008.

- 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.; THOMAZ, S. M.; & GOMES, L. C. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. **Conservation Biology**, v. 19, p. 646-652, 2005.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; & GOMES, L. C. Threats for biodiversity in the floodplain of the Upper Paraná River: effects of hydrological regulation by dams. **Ecohydrology and Hydrobiology**, v. 4, p. 255-256, 2004.
- AGOSTINHO, A. A.; VAZZOLER, A. E. A. de M.; & THOMAZ, S. M. The high river Paraná basin: limnological and ichthyological aspects. **Limnology in Brazil**, p. 59-103, 1995.
- AGOSTINHO, A.A.; & GOMES, L.C. Manejo e monitoramento de recursos pesqueiros: perspectivas para o Reservatório de Segredo. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. (Eds.) **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, p. 319-364, 1997.
- AGOSTINHO, C. S.; PELICICE, F. M.; MARQUES, E. E.; SOARES, A. B.; & DE ALMEIDA, D. A. A. All that goes up must come down? Absence of downstream passage through a fish ladder in a large Amazonian river. **Hydrobiologia**, v. 675, n. 1, p. 1-12, 2011.
- ALEXANDRE, P. C.; LUIZ, E. A.; PIANA, P. A.; GOMES, L. C.; & AGOSTINHO, A. A. Relação estoque-recrutamento para as piranhas *Serrasalmus marginatus* (Valenciennes, 1847) e *S. maculatus* (Kner, 1860) no rio Baía, alto rio Paraná. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 3, p. 303-307, 2008.
- ALLCOCK, A. L.; BARRATT, I.; ELEAUME, M.; LINSE, K.; NORMAN, M. D.; SMITH, P. J.; & STRUGNELL, J. M. Cryptic speciation and the circumpolarity debate: a case study on endemic Southern Ocean octopuses using the COI barcode of life. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, 58(1), 242-249, 2011.
- ANEEL. Agência nacional de energia elétrica, relatórios. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br/biblioteca/downloads/livros/RelatorioAneel2012.pdf>>. Acesso: 31/07/2015.
- ARAÚJO F. G.; & SANTOS L.N. Distribution of fish assemblages in Lajes reservoir, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 4, p. 563-576, 2001.
- ARIF, I. A.; & KHAN, H. A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 32, p. 9-17, 2009.
- BALLARD, J. W. O.; & WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 729-744, 2004.
- BALON, E. K. **Early life histories of fishes: new developmental, ecological and evolutionary perspectives**. Dr W. Junk. 1985.

- BAUMGARTNER, G.; NAKATANI, K.; CAVICCHIOLI, M.; & BAUMGARTNER, M. D. S. T. Some aspects of the ecology of fish larvae in the floodplain of the high Paraná river, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, n. 3, p. 551-563, 1997.
- BAUMGARTNER, G.; NAKATANI, K.; GOMES, L. C.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V. & MAKRAKIS, M. C. Fish larvae from the upper Paraná River: do abiotic factors affect larval density?. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 4, p. 551-558, 2008.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; & BOURNE, P. E. **The protein data bank**. Nucleic acids research, 28(1), 235-242. 2000.
- BERRA, T. M. **Freshwater fish distribution**. Academic Press, 2001.
- BIALETZKI, A.; NAKATANI, K.; SANCHES, P. V.; BAUMGARTNER, G.; & GOMES, L. C. Larval fish assemblage in the Baía River (Mato Grosso do Sul State , Brazil): temporal and spatial patterns. **Environmental Biology of Fishes**, v. 73, p. 37-47, 2005.
- BRANICKI, W.; KUPIEC, T.; PAWLOWSKI, R. Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. **Journal of forensic sciences**, v. 48, n. 1, p. 83-87, 2003.
- BRITTO, S. G. C.; & CARVALHO, E. D. Ecological attributes of fish fauna in the Taquaruçu reservoir, Paranapanema river (upper Paraná, Brazil): composition and spatial distribution. **Acta Limnologica Brasiliense**, v. 18, n. 4, p. 377-388, 2006.
- BRITTO, S. G. de C. **A estratégia reprodutiva dos peixes migradores frente às escadas do Complexo Canoas (Rio Paranapanema, Bacia do Alto Paraná)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).- Unesp, Botucatu. 2009.
- BRITTO, S. G.; CARVALHO, E. D. Reproductive migration of fish and movement in a series of reservoirs in the Upper Parana River basin, Brazil. **Fisheries Management and Ecology**, v. 20, n. 5, p. 426-433, 2013.
- BROWN, Wesley M.; GEORGE, Matthew; WILSON, Allan C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1967-1971, 1979.
- CANDEK, K.; & KUNTNER, M. DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales. **Molecular ecology resources**, v. 15, n. 2, p. 268-277, 2015.
- CARNELÓS, R. C.; & BENEDITO-CECILIO, E. Reproductive strategies of *Plagioscion squamosissimus* Heckel, 1840 (Osteichthyes Sciaenidae) in the Itaipu Reservoir, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 317-324, 2002.
- CARVALHO, E. D.; BATISTA DA SILVA; V. F., FUJIHARA, C. Y.; HENRY, R.; & FORESTI, F. Diversity of fish species in the River Paranapanema-Jurumirim Reservoir

- transition region (São Paulo, Brazil). **Italian Journal of Zoology**, v. 65, n. 1, p. 325-330, 1998.
- CARVALHO, R. A. D.; SANCHEZ, S.; SWARÇA, A. C.; FENOCCHIO, A. S.; MARTINS-SANTOS, I. C.; & DIAS, A. L. Chromosomal analyses in *Megalonema platanum* (Siluriformes: Pimelodidae), an endangered species from South American rivers. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 177-182, 2011.
- CIVERA, T. Species identification and safety of fish products. **Veterinary research communications**, v. 27, p. 481-489, 2003.
- COSTA, A. P. D.; OSCO, L. P.; COLADELLO, R.; & BOIN, M. N. Avaliação do uso e ocupação na cabeceira do rio Pirapozinho (SP). In: **Colloquium Humanarum**, v. 11, n. 2, p. 58-65, 2015.
- COSTA, M. D. P.; & SOUZA-CONCEIÇÃO, J. M. Composição e abundância de ovos e larvas de peixes na baía da Babitonga, Santa Catarina, Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 3, p. 372-382, 2009.
- CRAMPTON, W. G. R.; HOPKINS, C. D. Nesting and paternal care in the weakly electric fish *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) with descriptions of larval and adult electric organ discharges of two species. **Copeia**, v. 2005, n. 1, p. 48-60, 2005.
- CRANDALL, K. A.; BININDA-EMONDS, O. R.; MACE, G. M.; & WAYNE, R. K. Considering evolutionary processes in conservation biology. **Trends in ecology & evolution**, v. 15, n. 7, p. 290-295, 2000.
- CUNICO, A. M.; AGOSTINHO, A. A.; & LATINI, J. D. Influência da urbanização sobre as assembléias de peixes em três córregos Maringá, Paraná. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1101-1110, 2006.
- Da GRAÇA, W. J.; & PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, 2007.
- DAGA, V. S.; & GUBIANI, E. A. Variations in the endemic fish assemblage of a global freshwater ecoregion: Associations with introduced species in cascading reservoirs. **Acta Oecologica**, v. 41, p. 95-105, 2012.
- DE LIMA, A. F.; MAKRAKIS, M. C.; DA SILVA, P. S.; DE AZEVEDO, A. V.; MAKRAKIS, S.; DE ASSUMPCÃO; & DIAS, J. H. P. Padrões de distribuição e ocorrência espaço-temporal de ovos e larvas de peixes nos rios Pardo e Anhanduí, bacia do alto rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, 2013.
- De OLIVEIRA NALIATO, D. A.; NOGUEIRA, M. G.; & PERBICHE-NEVES, G. Discharge pulses of hydroelectric dams and their effects in the downstream limnological conditions: a case study in a large tropical river (SE Brazil). **Lakes & Reservoirs: Research & Management**, v. 14, n. 4, p. 301-314, 2009.
- DIAS, J. H. P. Distribuição espacial e temporal da ictiofauna do trecho médio do rio Paranapanema e suas relações com as características morfométricas e limnológicas dos

- compartimentos da bacia. Unpublished Ph. D. Thesis. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 103p, 2003.
- DIAS, J. H.; BRITTO, S. G. C.; VIANNA, N. C.; & GARAVELLO, J. C. Biological and ecological aspects of *Pinirampus pinirampu* (Spix, 1829), Siluriformes, Pimelodidae. Capivara reservoir, Paranapanema River Southern Brazil. **Acta Limnologica Brasileira**, v. 16, p. 293-304, 2004.
- DUKE ENERGY. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Editora Horizonte Geográfico. 2008.
- ESCHMEYER, W. N; FONG, J. D. **Catalog of Fishes: Species of fishes MZ**. California Academy of Sciences, 1998. Disponível em: <<http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>>. Acesso em: 28/01/2016.
- EWING, B.; & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II.
- FERGUSON, J. W. H. On the use of genetic divergence for identifying species. **Biological journal of the Linnean Society**, v. 75, n. 4, p. 509-516, 2002.
- FERREIRA M. E.; & GRATAPAGLIA D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análises genéticas**. Brasília: EMPRAPA-CENARGEN. 1995.
- FERREIRA, M. E.; & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20). 1995.
- FISHER, S. G.; HEFFERNAN, J. B.; SPONSELLER, R. A.; & WELTER, J. R. Functional ecomorphology: feedbacks between form and function in fluvial landscape ecosystems. **Geomorphology**, v. 89, n. 1, p. 84-96, 2007.
- FOGARTY, M. J.; SISSEWINE, M. P.; COHEN, E. B. Recruitment variability and the dynamics of exploited marine populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 6, p. 241-246, 1991.
- FRANKHAM, R.; BALOU, J. D.; & BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. 1.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.
- FRANTINE-SILVA, W.; SOFIA, S. H.; ORSI, M. L.; & ALMEIDA, F. S. DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. **Molecular ecology resources**, v. 15, p. 1226-1237, 2015.
- FREELAND, J. R. **Molecular ecology**. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester: Southern Gate, 2ª edição, 2005.
- FROESE, R.; & D. PAULY. Editors. 2015. **FishBase**. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (08/2015).

- GARCIA, D. A. Z.; CASIMIRO, A. C. R.; ORSI, M. L. Introduction of the armored catfish, *Pterygoplichthys ambrosettii* (Holmberg, 1893), in a large effluent of the Upper Parana River basin. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 1, p. 138-139, 2012.
- GHOVVATI, S.; NASSIRI, M. R.; MIRHOSEINI, S. Z.; MOUSSAVI, A. H.; & JAVADMANESH, A. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. **Food Control**, v. 20, n. 8, p. 696-699, 2009.
- GODINHO, A. L.; LAMAS, I. R.; & GODINHO, H. P. Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. **Environmental Biology of Fishes**, v. 87, n. 2, p. 143-162, 2010.
- GRAF, W. L. Downstream hydrologic and geomorphic effects of large dams on American rivers. **Geomorphology**, v. 79, n. 3, p. 336-360, 2006.
- HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v. 79, p. 413-425. 1998.
- HARTL, D. L.; & CLARK, A. J. **Princípios de Genética de Populações**. 3ed. ArtMed, Porto Alegre, p. 217, 2008.
- HAVEL, J. E.; LEE, C. E.; & ZANDEN, J. M. Do reservoirs facilitate invasions into landscapes? **BioScience**, v. 55, n. 6, p. 518-525, 2005.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; & DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Real Society B**, v. 270, p. 313-321, 2003.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; & DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Real Society B**, v. 270, p. 313-321, 2003.
- HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; & HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 14812-14817, 2004a.
- HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; & FRANCIS, C. M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, p. 312, 2004b.
- HEY, J.; WAPLES, R. S.; ARNOLD, M. L.; BUTLIN, R. K., & HARRISON, R. G. Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 11, p. 597-603, 2003.
- HOFFMANN, A. C.; ORSI, M. L.; & SHIBATTA, O. A. Diversidade de peixes do reservatório da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná, Brasil, e a importância dos grandes tributários na sua manutenção. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 95, n. 3, p. 319-325, 2005.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome research**, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

- HUBERT, N.; ESPIAU, B.; MEYER, C.; & PLANES, S. Identifying the ichthyoplankton of a coral reef using DNA barcodes. **Molecular ecology resources**, v. 15, n. 1, p. 57-67, 2015.
- HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N. E.; TAYLOR, E.; BURRIDGE, M.; & BERNATCHEZ, L. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **PLoS one**, v. 3, n. 6, p. 2490-2008.
- IUCN. **International Union for Conservation of Nature**. Disponível em: <<http://www.iucn.org/>>. Acesso: em 31 jul. 2015.
- JACQUES, G. S. **Identificação de espécies animais usando sequências de genes mitocondriais no combate aos crimes contra a fauna**. Tese (Doutorado Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília. 2005.
- JÚLIO JÚNIOR, H.F.; THOMAZ, S.M.; AGOSTINHO, A.A.; & LATINI, J.D. Distribuição e caracterização dos reservatórios. In **Biocenoses em Reservatórios (Padrões espaciais e temporais)**. Rodrigues, L; THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A.A.; & GOMES, L. C. RIMA, São Carlos, p.1-16. 2005.
- JÚLIO-JÚNIOR, F. H.; TÓS, C. D.; AGOSTINHO, Â. A.; & PAVANELLI, C. S. (2009). A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 709-718, 2009.
- KHEDKAR, G. D., JAMDADÉ, R., NAIK, S., DAVID, L., & HAYMER, D. Barcodes for the Fishes of the Narmada, One of India's Longest Rivers. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. 101460, 2014.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.
- KIPPER, D.; BIALETZKI, A.; & SANTIN, M. Composição Taxonômica da assembleia de larvas de peixes no reservatório de Rosana, Rio Paranapanema, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 421-426, 2011.
- KO, H. L.; WANG, Y. T.; CHIU, T. S.; LEE, M. A.; LEU, M. Y.; CHANG, K. Z.; & SHAO, K. T. Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA barcoding. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53451, 2013.
- KOCHER, T. D.; & STEPIEN, C. A. (Ed.). **Molecular systematics of fishes**. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1997.
- KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F. X.; & WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 16, p. 6196-6200, 1989.

- KOCHZIUS, M.; SEIDEL, C.; ANTONIOU, A.; BOTLA, S. K.; CAMPO, D., CARIANI, A.; & HREGGVIDSSON, G. Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p., 2010.
- LANGHEANI, F.; CASTRO, R. M. C.; OYAKAWA, O. T.; SHIBATTA, O. A.; PAVANELLI, C. S.; & CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 75-78, 2007.
- LEME, G. L. A.; COSTA, A. D. A.; GARCIA, D. A. Z.; Yabu, M. H. S.; & ORSI, M; L. O potencial do rio Anhumas como um dos principais afluentes do rio Paranapanema, no atual contexto de conservação de espécies nativas. **Boletim sociedade brasileira de ictiologia**, n. 115, 2015.
- 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.
- LIERMANN, C. R.; NILSSON, C.; ROBERTSON, J.; & NG, R. Y. Implications of dam obstruction for global freshwater fish diversity. **BioScience**, v. 62, n. 6, p. 539-548, 2012.
- LINACRE, A.; & TOBE, S. S. An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. **Investigative genetics**, v. 2, n. 1, p. 1, 2011.
- LOWE-MCCONNELL, RH. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, p. 534, 1999.
- LUCENA, A. L. M.; RENESTO, E.; OLIVEIRA, C.; MATEUS, R. P.; & ZAWADZKI, C. H. Genetic differentiation among ten populations of the genus *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper Paraná River basin. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 325–332, 2012.
- LUQUET, P.; BOUJARD, T.; PLANQUETTE, P.; MOREAU, Y.; & HOSTACHE, G. The culture of *Hoplosternum littorale*: state of the art and perspectives. **Advances in Tropical Aquaculture, Workshop at Tahiti, French Polynesia**. 1989.
- MAACK R.; **Geografia física do Estado do Paraná**. 3ª ed. Curitiba: Imprensa Oficial, 2002.
- MANWELL, C.; BAKER, C. M. a Sibling Species of Sea Cucumber Discovered By Starch Gel Electrophoresis. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 10, p. 39–53, 1963.
- MATARESE, A. C.; BLOOD, D. M.; PICQUELLE, S. J.; & BENSON, J. L. Atlas of abundance and distribution patterns of ichthyoplankton from the Northeast Pacific Ocean and Bering **Sea ecosystems**: based on research conducted by the Alaska Fisheries Science Center. (1972–1996). 2003.
- MATIOLI, S. R.; & FERNANDES, F. M. de C. **Biologia molecular e evolução**. Holos/Sociedade Brasileira de Genética, 2012.

- MATIOLI, S.R., & PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI S.R.; & FERNANDES F. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 153-161, 2001.
- MAYER, F.; DIETZ, C.; & KIEFER, A. Molecular species identification boosts bat diversity. **Frontiers in zoology**, v. 4, n. 1, p. 1, 2007.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA SECRETARIA DE ENERGIA ELÉTRICA | DEPARTAMENTO DE MONITORAMENTO DO SISTEMA ELÉTRICO. **Boletim Mensal de Monitoramento do Sistema Elétrico Brasileiro**. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/documents/10584/2027273/Boletim+de+Monitoramento+do+Sistema+El%C3%A9trico+-+Julho-2015.pdf/6969a2ee-7633-4f87-9585-9fc0a92c3ac7>> Acesso em: 21/09/2015.
- MORELLI, S.; VICARI, M. R.; & BERTOLLO, L. A. C. Evolutionary cytogenetics of the Hoplias lacerdae, Miranda Ribeiro, 1908 group. A particular pathway concerning the others Erythrinidae fish. **Brazilian Journal of Biology**. v. 67, p. 897-903, 2007.
- MORITZ, C. Defining “Evolutionarily Significant Units”. **Tree**, v. 9, p. 373-375, 1994.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; & PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001.
- NAKATANI, K.; BAUMGARTNER, G.; & CAVICCHIOLI, M. Ecologia de ovos e larvas de peixes. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. A. **planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, 1997.
- NAKATANI, K.; BIALETZKI, A.; SANTIN, M.; BORGES, R. Z.; ASSAKAWA, L. F.; ZIOBER, S. R.; KIPPER, D., GALUCH, A. V. & SUIBERTO, M. R. Ocorrência e abundância de larvas e juvenis de peixes em reservatórios. In: RODRIGUES, L.; THOMAZ S. M.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Biocenoses em reservatórios: padrões espaciais e temporais**. São Carlos: Rima, 2005.
- NEIRA, F. J.; & KEANE, J. P. Ichthyoplankton-based spawning dynamics of blue mackerel (*Scomber australasicus*) in south-eastern Australia: links to the East Australian Current. **Fisheries Oceanography**, v. 17, n. 4, p. 281-298, 2008.
- NELSON, J. S. **Fishes of the World**, 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken, 2006.
- OLIVEIRA, C. **Identificação molecular da diversidade com vistas a sua conservação**. In: Encontro sobre temas de genética e melhoramento. Universidade de São Paulo, USP, 2012.
- ORSI, M. L. **Estratégias reprodutivas de peixes: Estratégias reprodutivas de peixes da região média-baixa do rio Paranapanema, reservatório de Capivara**. São Paulo: Blucher, 2010.

ORSI, M. L.; & BRITTON, J. R. Long-term changes in the fish assemblage of a neotropical hydroelectric reservoir. **Journal of fish biology**, v. 84, n. 6, p. 1964-1970, 2014.

OYAKAWA, OT. **Revisão sistemática das espécies do gênero Hoplias grupo lacerdae da Amazônia Brasileira e região leste do Brasil**. (Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 1990.

OYAKAWA, O. T.; & MENEZES, N. A. Checklist dos peixes de água doce do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2011.

PARRA, E. J.; MARCINI, A.; AKEY, J.; MARTINSON, J.; BATZER, M. A.; COOPER, R.; FORRESTER, T.; ALLISON, D. B.; DEKA, R.; FERRELL, R. E.; & SHRIVER, M. D. "Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles". **The American Journal of Human Genetics**, v 63, p. 1839-1851, 1998.

PAZIAN, M. F.; PEREIRA, L. H. G.; SHIMANUKURO-DIAS, C. K.; OLIVEIRA, C.; & FORESTI, F. Cytogenetic and molecular markers reveal the complexity of the *Piabina* genus Reinhardt, 1867 (Characiformes: Characidae). **Genetic Molecular Biology**, v. 10, n. 2, p. 329-340, 2012.

PEGG, G. G.; SINCLAIR, B.; BRISKEY, L.; & ASPDEN, W. J. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef , **Australia. Scientia Marina**, v. 70, p. 7-12, 2006.

PEREIRA, L. H.; HANNER, R.; FORESTI, F.; & OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 20, 2013.

PEREIRA, L. H.; PAZIAN, M. F.; HANNER, R.; FORESTI, F.; & OLIVEIRA, C. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 22, n. 1, p. 87-96, 2011.

PETESSE, M. L.; & PETRERE, M. Tendency towards homogenization in fish assemblages in the cascade reservoir system of the Tietê river basin, Brazil. **Ecological Engineering**, v. 48, p. 109-116, 2012.

PFENNINGER, M. C.; NOWAK, C.; KLEY, D.; STEINKE, D.; & STREIT, B. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. **Molecular ecology**, v. 16, n. 9, p. 1957-1968, 2007.

PIERCE, B. A. **Genética um enfoque conceitual**. Guanabara Koogan, 2011.

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, n. 4, p. 1039–50, 2008.

- RAMOS, J. V. B.; SODRÉ, L. M. K.; ORSI, M. L.; ALMEIDA, F. S. Genetic diversity of the species *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes) in the Canoas Complex - Paranapanema River. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 821-828, 2012.
- RATNASINGHAM, S.; & HEBERT, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7, 355-364. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S. O; & FERRARI, C. J., JR. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EDPUCRS, Porto Alegre, Brasil. 2003.
- RIBEIRO, L. B.; MATOSO, D. A.; ALMEIDA, M. C.; VICARI, M. R.; MORAES, NETO A.; SVIDNICKI, M. C.; & ARTONI, R. F. Karyotypic variability in *Iheringichthys labrosus* (Teleostei, Pimelodidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). **Genetic Molecular Research**. v. 7, p. 718-724, 2008.
- RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 4, p. 1026-1033, 2006.
- SANTOS, F. R.; LACERDA, D.R.; REDONDO, R. A. F.; NASCIMENTO, A. M. A.; CHARTONI-SOUZA, E.; BORBA, E. L.; RIBEIRO, R. A.; & LOVATO, M. B. Diagnóstico do conhecimento da diversidade genética. UFMG, **Biota minas**, p. 390-410, 2009.
- SAUNDERS, G. W. A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose *Dilsea-Neodilsea* complex and *Weeksia*. **Botany**, v. 86, n. 7, p. 773-789, 2008.
- SCHNEIDER, R. M., FREIRE, R., COSSICH, E. S., SOARES, P. F., DE FREITAS, F. H., & TAVARES, C. R. G. Estudo da influência do uso e ocupação de solo na qualidade da água de dois córregos da Bacia hidrográfica do rio Pirapó. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 3, p. 295-303, 2011.
- SHIBATTA, O. A.; GEALH, A. M.; & BENNEMANN, S. T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotrop**, v. 7, n. 2, 2007.
- SHRIVER, M. D.; SMITH, M. W.; JIN, L.; MARCINI, A.; AKEY, J. M.; DEKA, R.; & FERRELL, R. E. "Ethnic-affiliation Estimation by Use of Population-specific DNA Markers". **The American Journal of Human Genetics**, v. 60, p. 957-964, 1997.
- SIMEPAR: **Boletim Climático para o Paraná**. Disponível em: < http://www.simepar.br/site/internas/conteudo/meteorologia/clima_estacoes/arquivos/outono2015.pdf >
Acesso em: 21/09/2015.
- SMITH, D. L.; & JOHNSON, K. B. **A Guide to marine Coastal Plankton and Marine Invertebrate Larvae**. 2nd. Ed. Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company, 1996.
- SODRÉ, L. M. K.; ALMEIDA, F. S.; & CHIARI, L. Variabilidade genética em peixes do rio Tibagi através de marcadores moleculares. In: MEDRI, M.E; BIANCHINI, E.;

- SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Org). **Estudos integrados da bacia do rio Tibagi**. 1ed. Londrina: Edição dos Editores, p. 531-550, 2002.
- SOLÉ-CAVA, A. J. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (org) **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Editora Holos, p. 171-190, 2001.
- SOULÉ, M. E. Conservation biology: the science of scarcity and diversity. sinauer associates, massachussets. 1984. apud BRUZZI, M. L. **Diversidade genética e conservação do Lobo-Guará, *Chrysocyon brachyurus*, em áreas protegidas do distrito federal**. Dissertação apresentada ao instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília para obtenção do Título de Mestre em Ecologia, 2007.
- STOCKLE, Mark Y.; HEBERT, Paul DN. Barcode of life. **Scientific American**, v. 299, n. 4, p. 82-88, 2008.
- SUZUKI, H. I.; PELICICE, F. M.; LUIZ, E. A.; LATINI, J. D.; & AGOSTINHO, A. A. Estratégias reprodutivas da assembléia de peixes da planície de inundação do alto rio Paraná. In: PELD (Pesquisas Ecológicas de Longa Duração–Org.) **A planície alagável do rio Paraná: estrutura e processos ambientais**. Maringá: PELD, 2002.
- SUZUKI, H. I.; VAZZOLER, A. E. A. de M.; MARQUES, E. E.; LIZAMA, M. de los A. P.; INADA, P. Reproductive ecology of the fish assemblage. In: THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). *The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation*. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, p. 271-292, 2004.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; & KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TELETCHEA, F. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 19, n. 3, p. 265-293, 2009.
- TOGAWA, R. C.; & BRÍGIDO, M. M. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In: **1 st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology-IcoBiCoBi**. Ribeirão Preto. 2003.
- TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; & HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia**. 2 ed, Porto Alegre: Artmed Editora, 2006.
- TUNDISI, J. G.; & STRASKRABA, M. **Theoretical reservoir ecology and its applications**. Leiden: Backhuys Publishers, 1999.
- VALDEZ-MORENO, M.; VÁSQUEZ-YEOMANS, L.; ELÍAS-GUTIÉRREZ, M.; IVANOVA, N. V.; & HEBERT, P. D. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. **Marine and Freshwater Research**, v. 61, n. 6, p. 655-671, 2010.
- VARELLA, H. R.; OLIVEIRA, A. K.; APONE, F.; LOPES, X. M.; SABBAG, A. F & GARAVELLO J. C. Composição da ictiofauna do médio rio Paranapanema no trecho

- entre os reservatórios de Salto Grande e Jurumirim, estados do Paraná e São Paulo. In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. p. 1-2, 2007.
- VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia reprodutiva de peixes teleósteos: Teoria e Prática**. Maringá: EDUEM, 1996.
- 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, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliense**, v. 20, p. 139-151, 2008.
- VICTOR, B. C.; HANNER, R.; SHIVJI, M.; HYDE, J.; & CALDOW, C. Identification of the larval and juvenile stages of the Cubera Snapper, *Lutjanus cyanopterus*, using DNA barcoding. **Zootaxa**, v. 2215, n. 2, 2009.
- VIEIRA F.; GOMES, J. P. G.; MAIA, B. P.; & MARTINS, L. G. **Peixes do quadrilátero ferrífero, guia de identificação**. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte. 2015.
- VOET, D.; VOET, J. G.; & PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.
- WARD, R. D.; HANNER, R.; & HEBERT, P. D. N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p329-356, 2009.
- WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; & HEBERT, P. D. N. Barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 360, p. 1847-1857, 2005.
- WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 29, p. 188-97, 2007.
- WITT, J.; THRELOFF, D. S.; DOUG, L.; & HEBERT, P. D. N. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 10, p. 3073-3082, 2006.
- WOLF, Christian; RENTSCH, Jürg; HÜBNER, Philipp. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1350-1355, 1999.
- WONG, K. L.; WANG, J.; BUT, P. P. H.; & SHAW, P. C. Application of cytochrome b DNA sequences for the authentication of endangered snake species. **Forensic science international**, v. 139, n. 1, p. 49-55, 2004.
- WOOTON, R. J. **Ecology of teleost fish**. 2ª ed. Dordrecht: Kluwer Academic.1998. apud AGOSTINHO, A. A., GOMES, L. C., & PELICICE, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. UEM, 2007.
- ZARDOYA, R.; & MEYER, A. The Complete Nucleotide Sequence of the Mitochondrial Genome of the Lungfish (*A-otqPterus dolloi*) Supports Its Phylogenetic Position as a Close Relative of Land Vertebrates. **Genetics**. v. 142, p. 1249-1263, 1996.

- ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; & MATEUS, R. P. Allozyme analysis of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the Rio Corumbá, upper Rio Paraná basin, Brazil. **Biochemical genetics**, v. 46, n. 11-12, p. 755–69, 2008.
- ZHANG, De X.; & HEWITT, G. M. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 6, p. 247-251, 1996.
- ZHANG, J. B.; & HANNER, R. DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 1, p. 31-42, 2011.
- ZHANG, J. B.; & HANNER, Robert. Molecular approach to the identification of fish in the South China Sea. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30621, 2012.
- ZIOBER, S. R.; BIALETZKI, A.; & MATEUS, L. A. de F. Effect of abiotic variables on fish eggs and larvae distribution in headwaters of Cuiabá River, Mato Grosso State, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 123-132, 2012.