



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FRANCINE MATIAS DE PAULA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Prochilodus lineatus*
(PISCES, CHARACIFORMES) DAS ESCADAS DE
TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES DAS USINAS
HIDROELÉTRICAS DO COMPLEXO CANOAS - RIO
PARANAPANEMA**

Londrina
2006

FRANCINE MATIAS DE PAULA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Prochilodus lineatus*
(PISCES, CHARACIFORMES) DAS ESCADAS DE
TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES DAS USINAS
HIDROELÉTRICAS DO COMPLEXO CANOAS - 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 em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leda Maria Koelblinger Sodré.

Londrina
2006

**CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO ELABORADA PELA DIVISÃO DE
PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P324d Paula, Francine Matias de.
Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do complexo Canoas - Rio Paranapanema / Francine Matias de Paula. – Londrina, 2006.
138f. : il.

Orientador: Leda Maria Koelblinger Sodré.
Disserta o (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, 2006.
Inclui bibliografias.

1. *Prochilodus lineatus* – Teses. 2. Transposi o de peixes – Teses. 3. Diversidade genética – Teses. 4. Genética molecular – Teses. I. Sodré, Leda Maria Koelblinger. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 636.082:639.3

FRANCINE MATIAS DE PAULA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Prochilodus lineatus*
(PISCES, CHARACIFORMES) DAS ESCADAS DE
TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES DAS USINAS
HIDROELÉTRICAS DO COMPLEXO CANOAS - RIO
PARANAPANEMA**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Leda Maria Koelblinger Sodr^e
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Alberto José Prioli
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Sílvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 17 de fevereiro de 2006.

PAULA, Francine Matias. **Diversidade Genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) nas escadas de transposição de peixes das usinas hidrelétricas do Complexo Canoas - rio Paranapanema.** 2006. 138f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

A fragmentação dos regimes hídricos naturais, causada por interferência antrópica, é provavelmente o fator principal na redução de espécies migradoras neotropicais, uma vez que pode dificultar a estratégia reprodutiva, causar perda da variabilidade genética e redução dos estoques nativos. Em uma tentativa de minimizar o impacto do represamento para espécies migradoras de peixes, escadas de transposição são construídas ao lado das barragens hidroelétricas para permitir a ascensão dos peixes migradores à porção montante. Tendo em vista a falta de informações sobre os efeitos destas escadas de transposição sobre a diversidade genética em peixes, tem-se como objetivo deste trabalho contribuir com o conhecimento da eficiência das escadas de transposição construídas no Complexo Canoas – rio Paranapanema (Brasil), através de análises genéticas da estrutura populacional da espécie *Prochilodus lineatus* utilizando as técnicas de RAPD e microssatélites. Os exemplares de *P. lineatus* foram divididos em grupos, conforme sua data de coleta: 4 de Canoas I e 4 de Canoas II. As análises genéticas por meio do marcador RAPD, indicaram uma variabilidade genética alta ($\bar{P} \approx 70\%$) e uma baixa diferenciação genética entre os grupos de *P. lineatus* de cada escada de transposição ($F_{ST} = 0,0324$). As análises genéticas realizadas com microssatélite de maneira comparativa entre os agrupamentos CI e CII corroboraram com as análises de RAPD exibindo um baixo valor de diferenciação genética entre os agrupamentos ($F_{IT} = 0,2592$; $F_{IS} = 0,2549$; $F_{ST} = 0,059$). Assim, os diversos parâmetros de diversidade genética utilizados, tanto nas análises com RAPD quanto com microssatélite evidenciaram a existência de uma única população de *P. lineatus* no Complexo Canoas proveniente do reservatório de Capivara (jusante de Canoas I) que é provavelmente mantida pelos principais afluentes deste reservatório, os rios Tibagi e das Cinzas. Diante de dados que indicam que após a transposição não há conclusão do ciclo reprodutivo, a presença das escadas de transposição de peixes no Complexo Canoas pode ser considerada inadequada e a longo prazo, comprometer a sobrevivência de *P. lineatus*. Assim, como medidas de manejo, torna-se indispensável a preservação desses tributários na manutenção dos estoques naturais dessa espécie, assim como o fechamento das escadas de transposição durante o período reprodutivo dessa espécie.

Palavras-chave: *Prochilodus lineatus*. Escadas de transposição de peixes. Diversidade genética. RAPD e Microssatélite.

PAULA, Francine Matias. **Genetic Diversity of Prochilodus lineatus (Pisces, Characiformes) on the fish passage ladders of the hydro power plants Complex Canoas - Paranapanema River.** 2006. 138f. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

The aim of this work was to contribute to our understanding of the effects of fish passage ladders on the genetic diversity of fish by conducting genetic study of the population structure of the species *Prochilodus lineatus* collected in the passage ladders of Canoas I and Canoas II - Paranapanema River (Brazil) utilizing the RAPD and microsatellite techniques. Analyses with both markers indicated a high genetic variability ($P \gg 70\%$ and $H_o \gg 67\%$) and low genetic differentiation ($F_{ST} = 0.0324$ and $F_{ST} = 0.0017$, for RAPD and microsatellite, respectively) among the groups of *P. lineatus* collected at each passage ladder. The various parameters of genetic diversity determined indicated the existence of a single population of *P. lineatus* in the Canoas Complex originating from the Capivara Reservoir (downstream from Canoas I), probably fed by the Tibagi and Cinzas Rivers. In view of the findings that indicated that after passage there is no completion of the reproductive cycle, the presence of the fish passage ladders in the Canoas Complex can be considered impacting, where they cause a depletion in the recruitment downstream, which in the long term can compromise the natural population of *P. lineatus* in the middle of the Paranapanema River.

Keywords: *Prochilodus lineatus* .Genetic Diversity. Fish passage ladders. RAPD and microsatellite.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Exemplar de *Prochilodus lineatus* 15
- Figura 2** – Mapa mostrando a drenagem do rio Paranapanema, da nascente a foz, destacando o Complexo Canoas em sua porção média. A = UHE Canoas I e B = UHE Canoas II 19
- Figura 3** – Corte transversal do rio Paranapanema com todas as usinas hidroelétricas presentes em seu curso (1 → UHE Jurumirim; 2 → UHE Piraju; 3 → UHE Paranapanema; 4 → UHE Chavantes; 5 → UHE Salto Grande; 6 → UHE Canoas II; 7 → UHE Canoas I; 8 → UHE Capivara; 9 → UHE Taquaruçu e 10 → UHE Rosana. Em destaque as UHEs Canoas I e II do Complexo Canoas 20
- Figura 4** – Escada de transposição de peixes da UHE Canoas II. A) porção inicial da escada, a jusante e B) porção média e final da escada 21
- Figura 5** – Comportamento “dominante” de marcadores RAPD. Os painéis ilustram a correspondência que existe entre fenótipos RAPD no gel de eletroforese e respectivos genótipos. O fenótipo “presença de banda” (painéis A e B) pode corresponder a dois genótipos diferentes (homozigotos e heterozigotos). O painel C ilustra causas de fenótipo nulo (ausência de banda) 30
- Figura 6** – Base genética e detecção de polimorfismos de microsatélites. Painéis A e B ilustram genótipos homozigoto (alelos iguais) e heterozigoto (alelos diferentes) para uma região genômica que compreende um microsatélite de elementos (CA)/(GT). Painel C ilustra um gel de eletroforese com diferentes genótipos homozigotos (banda única) e heterozigotos (duas bandas) em indivíduos diplóides 33
-
- ### ARTIGO
- Figura 1** – Visão parcial do Rio Paranapanema e seus principais afluentes (rios Tibagi e das Cinzas). Em destaque, os dois locais de coleta: UHE Canoas I e UHE Canoas II 44

- Figura 2** – Teste de reprodutibilidade da reação de amplificação para 4 amostras de *P. lineatus* através do *primer* OPW6. Em (a) e (b) estão os perfis obtidos para cada amplificação realizada, sendo M o marcador de peso molecular, 1-4 as amostras de *P. lineatus* utilizadas e C o controle negativo da reação48
- Figura 3** – Perfil eletroforético de RAPD para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I, obtido com o *primer* OPW9. A coluna M representa o marcador de peso molecular de 100 bp, B o controle e as demais colunas os diferentes espécimes analisados dos grupos A, B, C e D.....53
- Figura 4** – Perfil eletroforético de RAPD para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas II, obtido com o *primer* OPW9. A coluna M representa o marcador de peso molecular de 100 bp, B o controle e as demais colunas os diferentes espécimes analisados dos grupos E, F, G e H.....53
- Figura 5** – Proporção de locos polimórficos de RAPD com diferença significativa nas frequências alélicas (pelo teste G), para as combinações entre os 4 grupos de *Prochilodus lineatus* da escada de transposição de peixes da UHE Canoas I – rio Paranapanema62
- Figura 6** – Proporção de locos polimórficos de RAPD com diferença significativa nas frequências alélicas (pelo teste G), para as combinações entre 4 grupos de *Prochilodus lineatus* da escada de transposição de peixes da UHE Canoas II – rio Paranapanema62
- Figura 7** – Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I. Grupos A, B, C e D.....64
- Figura 8** – Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas II. Grupos E, F, G e H.....64

| | |
|---|----|
| Figura 9 – Perfil eletroforético de RAPD para <i>Prochilodus lineatus</i> , capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I e II, obtido com o <i>primer</i> OPC 15. A coluna M representa o marcador de peso molecular de 100 bp, B controle e as demais colunas os diferentes espécimes analisados dos grupos A, B, C, D, F, G e H..... | 65 |
| Figura 10 – Proporção de locos polimórficos de RAPD com diferença significativa nas frequências alélicas (pelo teste G), para as combinações entre 8 grupos de <i>Prochilodus lineatus</i> da escada de transposição de peixes das UHEs Canoas I e II – rio Paranapanema..... | 69 |
| Figura 11 – Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, para <i>Prochilodus lineatus</i> , capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I e Canoas II. Grupos A, B, C, D, E, F, G e H | 70 |
| Figura 12 – Perfil eletroforético para o loco <i>pl 1</i> de microssatélite obtido para <i>Prochilodus lineatus</i> , capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I (1-11). Em branco estão dispostos os fenótipos atribuídos para cada amostra de <i>P. lineatus</i> . A coluna M representa o marcador | 75 |
| Figura 13 – Perfil eletroforético para o loco <i>64</i> de microssatélite obtido para <i>Prochilodus lineatus</i> , capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I (1-7). Em branco estão dispostos os fenótipos atribuídos para cada amostra de <i>P. lineatus</i> . A coluna M representa o marcador | 75 |
| Figura 14 – Perfil eletroforético para o loco <i>102</i> de microssatélite para <i>Prochilodus lineatus</i> , capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas II (1-10). Em branco estão dispostos os fenótipos atribuídos para cada amostra de <i>P. lineatus</i> . A coluna M representa o marcador | 75 |
| Figura 15 – Dados de frequências alélicas para o loco <i>pl 1</i> de <i>Prochilodus lineatus</i> das escadas de transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II- rio Paranapanema | 78 |

| | |
|---|----|
| Figura 16 – Dados de frequências alélicas para o loco 64 de <i>Prochilodus lineatus</i> das escadas de transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema | 79 |
| Figura 17 – Dados de frequências alélicas para o loco 102 de <i>Prochilodus lineatus</i> das escadas de transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II..... | 79 |

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

- Tabela 1** – Proporção de locos polimórficos (\bar{P}) e índice de diversidade nucleotídica (π_n) para os grupos de *Prochilodus lineatus* provenientes das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.....54
- Tabela 2** – Distância genética (D), identidade genética (I), teste F_{ST} , número de migrantes por geração (Nm) e teste exato de Fisher entre os grupos A, B, C e D de *Prochilodus lineatus* da escada de transposição de peixes da UHE Canoas I e entre os grupos E, F, G e H de *P. lineatus* de Canoas II.....57
- Tabela 3** – Análise molecular de variância (AMOVA) para os grupos de *Prochilodus lineatus* coletados nas escadas de transposição de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema60
- Tabela 4** – Proporção de locos polimórficos (\bar{P}) e índice de diversidade nucleotídica (π_n) para os grupos de *P. lineatus* provenientes das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.....66
- Tabela 5** – Distância genética (D), identidade genética (I), teste F_{ST} , número de migrantes por geração (Nm) e teste exato de Fisher entre os 8 grupos de *Prochilodus lineatus* da escada de transposição de peixes da UHE Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema67
- Tabela 6** – Dados da análise molecular de variância (AMOVA) realizada com os 8 grupos de *Prochilodus lineatus* coletados nas escadas de transposição de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.....68
- Tabela 7** – Proporção de locos polimórficos com diferenças significativas nas frequências alélicas, obtidos pelo teste G (G), distância genética (D), identidade genética (I), teste F_{ST} , número de migrantes por geração (Nm) e teste exato de Fisher entre *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de peixes de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.....72

| | |
|--|----|
| Tabela 8 – Dados da análise molecular de variância (AMOVA) realizada com os agrupamentos de <i>Prochilodus lineatus</i> de Canoas I e Canoas II - rio Paranapanema..... | 72 |
| Tabela 9 – Heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índices de fixação (F_{IS}), teste de equilíbrio genético (E.H.W) para <i>Prochilodus lineatus</i> das escadas de transposição das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema | 76 |
| Tabela 10 – Significância dos testes de diferenciação gênica e genotípica entre os agrupamentos de Canoas I e Canoas II para os locos <i>pl 1, 64 e 102</i> | 80 |
| Tabela 11 – Dados da análise molecular de variância (AMOVA) realizada entre os agrupamentos de <i>Prochilodus lineatus</i> das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II - rio Paranapanema..... | 81 |
| Tabela 12 – Valores da estatística F (F_{IT} , F_{ST} e F_{IS}), distância (D) e identidade (I) genética, número de migrantes por geração (Nm) obtidos para <i>Prochilodus lineatus</i> das escadas de transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema..... | 82 |
| Tabela 13 – Grupos de <i>Prochilodus lineatus</i> coletados nas escadas de transposição de Canoas I e Canoas II, suas respectivas datas de coleta e número de amostras analisadas..... | 83 |
| Tabela 14 – Dados da análise molecular de variância (AMOVA) dos grupos de <i>Prochilodus lineatus</i> das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II - rio Paranapanema | 84 |
| Tabela 15 – Valores da estatística F (F_{IT} , F_{ST} e F_{IS}), número de migrantes por geração (Nm) obtidos para os grupos de <i>Prochilodus lineatus</i> das escadas de transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema..... | 15 |

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 1.1.1 Considerações sobre <i>Prochilodus lineatus</i> | 15 |
| 1.1.2 Rio Paranapanema e Complexo Canoas | 17 |
| 1.1.3 Escadas de transposição de peixes | 21 |
| 1.1.4 Variabilidade genética, estrutura populacional, manejo e conservação de peixes | 25 |
| 1.1.5 Marcadores RAPD | 27 |
| 1.1.6 Marcadores Microssatélites..... | 31 |
| | |
| 2 OBJETIVOS | 35 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 35 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 35 |
| | |
| ARTIGO | 37 |
| 1 INTRODUÇÃO | 39 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 43 |
| 2.1 Coleta das amostras | 43 |
| 2.2 Extração e quantificação de DNA..... | 45 |
| 2.3 Marcadores RAPD | 45 |
| 2.3.1 Reação de amplificação do DNA..... | 45 |
| 2.3.2 Análise Eletroforética..... | 46 |
| 2.3.3 Análises estatísticas | 48 |
| 2.4 Marcadores Microssatélites..... | 50 |
| 2.4.1 Reação de amplificação do DNA..... | 50 |
| 2.4.2 Análise Eletroforética..... | 51 |
| 2.4.3 Análises estatísticas | 52 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 53 |
| 3.1 Marcadores RAPD | 53 |
| 3.2 Marcadores Microssatélites..... | 73 |

| | |
|------------------------------------|------------|
| 4 CONCLUSÕES | 93 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 95 |
| REFERÊNCIAS..... | 104 |
| ANEXOS | 116 |
| ANEXO 1..... | 117 |
| ANEXO 2..... | 120 |
| ANEXO 3..... | 123 |
| ANEXO 4..... | 131 |

1 INTRODUÇÃO

Os peixes se apresentam como os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida. Existem aproximadamente 20.000 espécies de peixes descritas sendo que a maior parte habita águas quentes dos oceanos tropicais, perfazendo um total de 40%. Os peixes de água doce são responsáveis por 20 a 25% da biodiversidade dos vertebrados e há indícios de que somente na América do Sul ocorram mais de 8.000 espécies, tendo em vista apenas duas ordens descritas (Characiformes e Siluriformes) (LOWE-McCONNEL, 1999; TORRES; MATOSO; ARTONI, 2004).

Segundo Ormerod (2003) essa enorme biodiversidade de peixes nos supre não somente as necessidades alimentares com as diversas espécies exploradas, mas também pode ser utilizada no manejo de ecossistemas, como por exemplo, no controle de mosquitos vetores de doenças, no controle de vegetação aquática invasiva e em biomanipulações, usadas às vezes na restauração de sistemas aquáticos. Além disso, é reconhecida a grande contribuição nos processos do ecossistema, os quais incluem a participação na cadeia trófica, a transferência de energia entre os níveis tróficos e o transporte de nutrientes entre os ecossistemas marinhos, de água doce e terrestre.

A fauna de peixes de água doce no Brasil é particularmente diversa e muitas das espécies que a compõem não são encontradas naturalmente fora da América do Sul. Essa diversidade suporta um número elevado de estoques naturais, os quais vêm sofrendo sensíveis reduções nos cursos d'água, como resultado da exploração desordenada dos recursos, pela captura de indivíduos jovens, pela pesca predatória, falta de fiscalização e medidas protecionistas e principalmente pela crescente fragmentação dos rios devido à construção de empreendimentos hidrelétricos, que modificam as áreas de desova coletivas e interrompem o trajeto de algumas espécies. Desta maneira, torna-se fundamental o conhecimento da biologia e da dinâmica populacional destes animais para a tomada de medidas racionais na preservação dos estoques (AGOSTINHO et al., 2002; HILSDORF; PETRERE, 2002; CAROSFELD et al. 2003).

O processo de construção de barragens e conseqüente formação de reservatórios para fins hidroelétricos conduz a alterações das características físicas,

químicas, sanitárias e biológicas do rio. Modifica a intensidade, duração e época das cheias, reduzindo os nutrientes disponíveis e as áreas sazonalmente alagáveis, criando nos segmentos imediatamente abaixo, condições térmicas e hidrodinâmicas muito instáveis. Além disso, a construção dessas barragens intercepta a rota migratória de diversas espécies causando impactos sobre a capacidade biogênica do sistema, disponibilidade de alimento e abrigo para formas jovens de peixes (THOMAZ; ROBERTO; BINI, 1997; AGOSTINHO; GOMES, 2005).

Os peixes migradores, portanto, são particularmente sensíveis aos efeitos prejudiciais das represas hidroelétricas, já que estas variações atuam sobre o sucesso reprodutivo. No Brasil muitas das populações destes peixes se mostram em rápido declínio, podendo, num futuro próximo, ter sua sobrevivência comprometida (AGOSTINHO; JULIO; BORGHETTI, 1992; CAROSFELD et al., 2003; BRITTO; SIROL, 2005). Em função disso, a legislação ambiental vigente no país exige do empreendedor responsável pela barragem a proposição de um programa de conservação de organismos aquáticos de modo a minimizar o impacto destes represamentos (CESP, 2000).

De acordo com Agostinho et al. (2002), em função das leis implementadas no país, foram construídas em barragens escadas para transposição de peixes, no entanto, após a construção, nenhuma avaliação sistemática foi realizada nesses empreendimentos. Desde modo dados sobre a verdadeira efetividade deste mecanismo e a importância dessa transposição para a preservação dos estoques da bacia ainda são desconhecidos.

Sabendo que a existência de barreiras geográficas, como barragens, isola populações, fica claro que a longo prazo tais empreendimentos poderão causar a redução do fluxo gênico, mudanças significativas nas frequências alélicas, polimorfismos intraespecíficos, e conseqüentemente a diminuição da variabilidade genética entre estas populações (AGOSTINHO et al., 2002; HATANAKA; GALETTI, 2003).

Sendo a variabilidade genética um componente fundamental da biodiversidade, formando a base da diversidade das espécies e dos ecossistemas, e representando uma das condições necessárias para a mudança evolutiva, esta representa todas as diferenças geneticamente determinadas que podem ocorrer entre os indivíduos de uma espécie na expressão de uma ou um conjunto de características. A presença da variabilidade genética herdável nas características

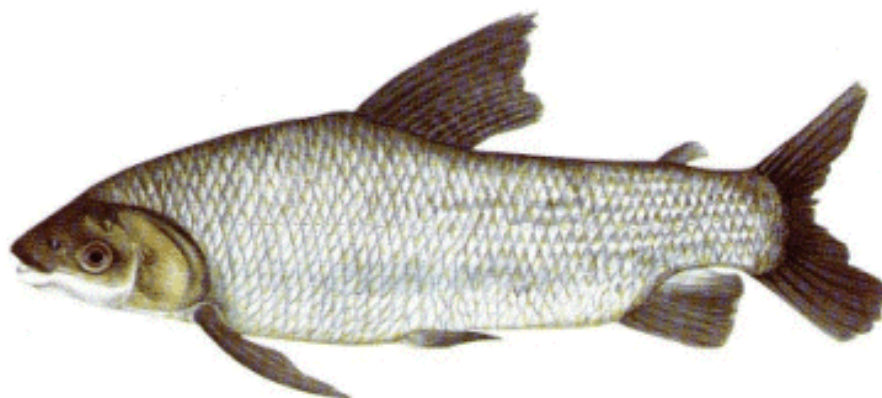
adaptativas fornece uma plasticidade fenotípica às populações, o que permite uma maior chance destas se adaptarem a mudanças estacionais e/ou temporais, aumentando, portanto a capacidade de sobrevivência destas diante de mudanças no meio ambiente (CARVALHO, 1993; EPA, 2001).

Técnicas moleculares como isoenzimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites, entre outras, têm sido amplamente utilizadas para estudos da diversidade genética. Neste estudo foram utilizadas as técnicas de RAPD e microssatélites para avaliar a estrutura populacional de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição dos reservatórios de Canoas I e II durante piracemas, a fim de verificar a efetividade da transposição e a preservação dos estoques.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Considerações sobre *Prochilodus lineatus*

A espécie utilizada neste trabalho foi *Prochilodus lineatus* (Figura 1) pertencente à ordem Characiformes, sub-ordem Characoidei e família Prochilodontidae (GODOY, 1975; NELSON, 1994; CASTRO; VARI, 2003).



FONTE: www.polmil.sp.gov.br/unidades/cpfm/tab_peixe.htm

Figura 1 – Exemplar de *Prochilodus lineatus*

Os membros da família Prochilodontidae possuem tamanhos variando entre médio e grande e corpo recoberto por grandes escamas, podem ser facilmente diferenciados dos outros peixes por sua boca subterminal provida de lábios grossos onde podem ser notadas duas séries de dentes diminutos e ganchiformes. São limnófagos (ou iliófagos) ingerindo grandes quantidades de lodo com matéria orgânica em fases avançadas de dissociação, juntamente com microrganismos, a partir de depósitos de fundo ou sobre substratos verticais, exibindo especializações anatômicas refinadas no trato digestivo, como por exemplo o estômago mecânico além do químico (GODOY, 1975; PAIVA; ANDRADE-TUBINO; GODOY, 2002; CASTRO; VARI, 2003).

A espécie *Prochilodus lineatus* foi descrita por Valenciennes em 1836, sendo popularmente conhecida como curimba ou curimbatá. Tem como principais características morfológicas um focinho peculiar, boca subterminal, cor prateada-acinzentada, ventre e face brancos, corpo fusiforme e comprido. São peixes migradores e reofílicos (peixes de piracema), devem migrar contra a correnteza dos rios para os estímulos sexuais e necessitam de ambientes lóticos para desova. Possuem periodicidade reprodutiva sazonal com picos (novembro – fevereiro), fecundação externa, desova total, alta fecundidade, não demonstrando cuidado com a prole (GODOY, 1975; VAZZOLER, 1996; PAIVA; ANDRADE-TUBINO; GODOY, 2002; ORSI, 2005). Uma vez que essa espécie habita águas correntes, quando colocada em tanques ou represas embora apresente desenvolvimento dos ovários, não desova naturalmente, sendo necessária a indução à reprodução através de injeção de hormônios gonadotrópicos (RAMAGOSA; NAHARA; GODINHO, 1985).

Segundo alguns autores *Prochilodus lineatus* é uma espécie que vem despertando interesse para aquicultura devido a seu hábito alimentar iliófago, à alta fecundidade e ao bom desempenho zootécnico (RAMAGOSA; NARAHARA; GODINHO, 1985; KUNKEL; FLORES, 1994). Segundo Castro e Vari (2003), essa espécie é altamente abundante nos rios Paraná, La Plata e Uruguai, tendo uma grande representação pesqueira.

Análises cariotípicas desta espécie revelaram um número cromossômico $2n = 54$, com cromossomos do tipo meta-submetacêntrico indicando ainda a ocorrência de pequenos cromossomos supranumerários (cromossomos B)

que variam tanto intra quanto inter-individualmente (CASTRO; VARI, 2003; JESUS et al., 2003).

A presença destes cromossomos supranumerários foi inicialmente detectada para esta espécie por Pauls e Bertollo (1983). Segundo esses autores esses cromossomos possuem uma natureza heterocromática e um comportamento instável na meiose e mitose podendo variar em número entre os indivíduos dentro de uma mesma população. Oliveira et al. (1997) descrevem em seus estudos uma variação de 0 a 7 cromossomos B em *Prochilodus lineatus*.

Os poucos trabalhos encontrados sobre variabilidade genética e estrutura populacional de *P. lineatus* (REVALDAVES; RENESTO; MACHADO, 1997; SIVASUNDAR; BERMINGHAN; ORTÍ, 2001; ZENATTI, 2003) indicam a importância de estudos para obtenção de novas informações a respeito da estrutura de populações e diversidade genética dessa espécie, a fim de que, programas de conservação possam ser melhores delineados.

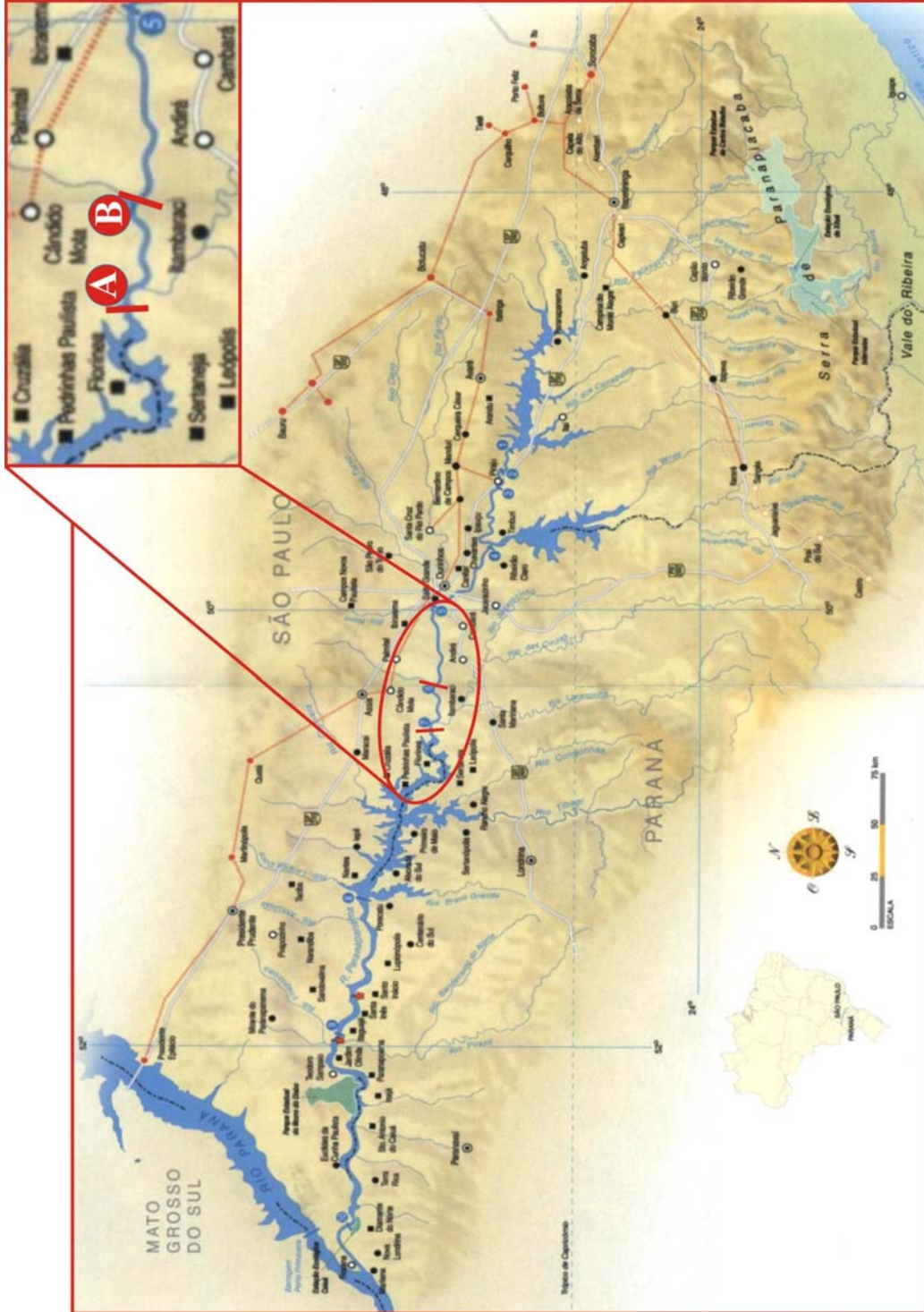
1.1.2 Rio Paranapanema e Complexo Canoas

O rio Paranapanema é um importante afluente da margem esquerda do rio Paraná e faz parte da Bacia do Alto Paraná. A partir de sua nascente, no município de Capão Bonito (SP), ele percorre cerca de 660 km com orientação geral a noroeste. Ao longo dessa extensão apresenta um desnível de 542 m, afluindo no rio Paraná entre os municípios de Rosana (SP) e Marilena (PR). Sua área de drenagem abrange uma superfície em torno de 109.600 km², estabelecendo uma divisa natural entre os estados de Paraná e São Paulo (DUKE ENERGY – GERAÇÃO PARANAPANEMA, 2003) (Figura 2).

O aproveitamento hidroelétrico do rio Paranapanema iniciou-se com a inauguração da usina Paranapanema, em Piraju (SP), em 1936. Atualmente existem neste rio dez usinas hidrelétricas (UHE) em operação: UHE Jurumirim, UHE Piraju, UHE Paranapanema, UHE Chavantes, UHE Salto Grande, UHE Canoas II, UHE Canoas I, UHE Capivara, UHE Taquaruçu e UHE Rosana (ZOCCHI, 2002; DIAS, 2003) (Figura 3).

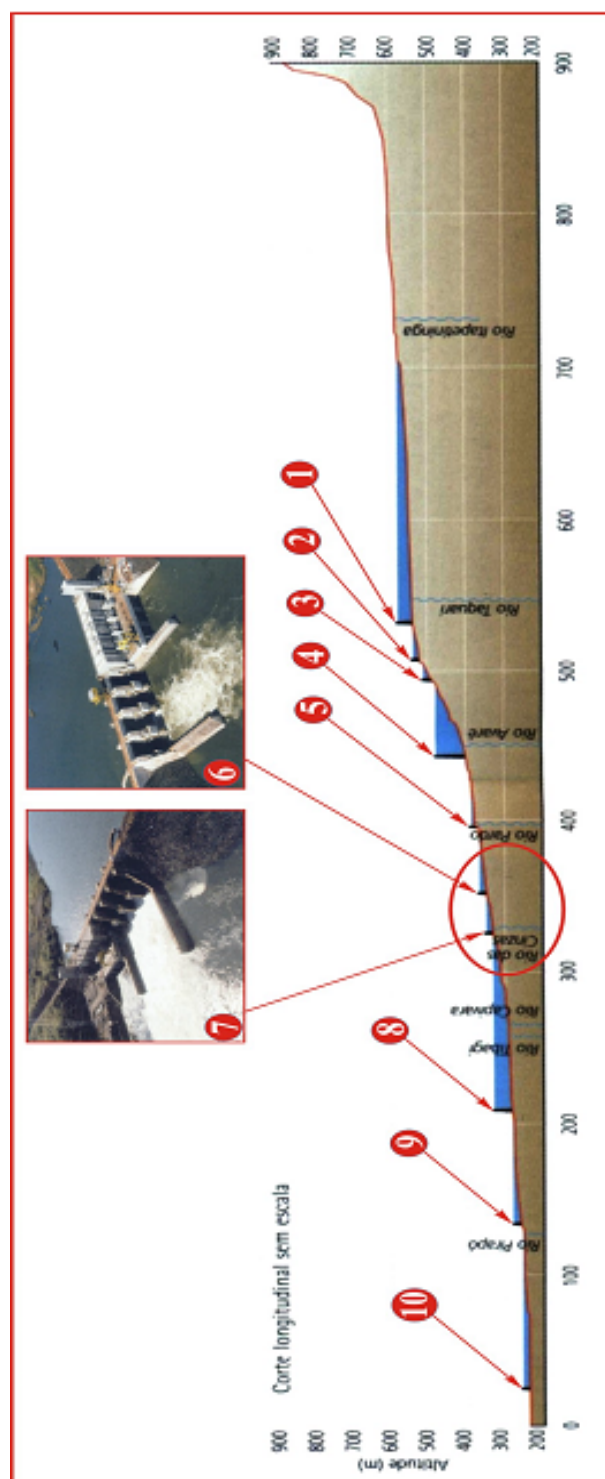
A área que foi contemplada pelo presente estudo, Complexo Canoas, é a que abrange as UHEs Canoas I e Canoas II, com reservatórios do tipo fios d'água, que em geral possuem áreas alagadas e profundidade moderada, além de baixo tempo de residência de água no reservatório (DUKE ENERGY – GERAÇÃO PARANAPANEMA, 2003).

O reservatório Canoas I foi formado pela UHE Canoas I em 1998 e inaugurado em 1999. Encontra-se nas imediações da foz do ribeirão Queixada, nas coordenadas 50° 31'W e 22° 56'S, tendo também como tributário o rio Pari. Sua largura está em torno de 300 m, sua altitude é de 351 m e sua profundidade atinge até 5m. Possui um perímetro de 120,3 km, uma potência de 82,5 MW e uma área de drenagem de 40.920 Km². O seu leito é arenoso com afloramentos localizados de rochas e suas margens são ocupadas por pastagens, com remanescentes de vegetação ciliar (DIAS, 2003; DUKE ENERGY - GERAÇÃO PARANAPANEMA, 2003).



FONTE: DUKE ENERGY – GERAÇÃO PARANAPANEMA (2003).

Figura 2 – Mapa mostrando a drenagem do rio Paranapanema, da nascente a foz, destacando o Complexo Canoas em sua porção média. A = UHE Canoas I e B = UHE Canoas II.



FONTE: DUKE ENERGY - GERAÇÃO PARANAPANEMA (2003)

Figura 3 – Corte transversal do rio Paranapanema com todas as usinas hidroelétricas presentes em seu curso (1 → UHE Jurumirim; 2 → UHE Piraju; 3 → UHE Paranapanema; 4 → UHE Chavantes; 5 → UHE Salto Grande; 6 → UHE Canoas II; 7 → UHE Canoas I; 8 → UHE Capivara; 9 → UHE Taquaruçu e 10 → UHE Rosana. Em destaque as UHEs Canoas I e II do Complexo Canoas.

O reservatório Canoas II foi formado pela UHE Canoas II em 1998 e inaugurado em 1999. Localiza-se nas imediações do eixo da UHE Canoas II nas coordenadas 50° 15'W e 22° 56'S tendo como principal tributário o ribeirão Alambari. Sua largura está em torno de 300 m, sua altitude é de aproximadamente 366 m e sua profundidade atinge até 5 m. Tem um perímetro de 98,8 km, uma potência de 72 MW e uma área de drenagem de 39.556 km². Também como o reservatório de Canoas I possui um leito arenoso com afloramentos localizados de rochas e suas margens são ocupadas por pastagens, com remanescentes de vegetação ciliar (DIAS, 2003; DUKE ENERGY - GERAÇÃO PARANAPANEMA, 2003).

Nas duas UHEs, Canoas I e Canoas II, foram construídas escadas de transposição de peixes como uma medida de aproximar o rio de suas condições naturais, as quais começaram a operar em novembro de 2000 (BRITO; SIROL, 2005). A figura 4 evidencia a escada de transposição localizada na UHE Canoas II.



Figura 4 – Escada de transposição de peixes da UHE Canoas II. A) porção inicial da escada, a jusante e B) porção média e final da escada.

1.1.3 Escadas de transposição de peixes

Conforme Nogueira (2005), a construção de reservatórios ao longo do século XX caracterizou-se por grandes empreendimentos localizados em diversos continentes, o que levou à regulação de imensos volumes de água e à inundação de

áreas em torno de 400.000 km². Nos últimos anos essa tendência diminuiu significativamente nos países desenvolvidos, embora naqueles em desenvolvimento ainda seja freqüente a formação de reservatórios com o objetivo de fomentar o desenvolvimento socioeconômico.

Esses mesmos autores afirmam que em nosso país, os reservatórios estão associados a uma ampla rede de produção de hidroeletricidade, um serviço considerado vital para a manutenção da sociedade e cujos interesses, geralmente se contrapõem às questões ambientais.

Juntos, os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná somam 40 grandes hidroelétricas que alagaram uma área superior a um milhão e duzentos mil hectares. A organização deste complexo gerador de energia foi imperiosa e necessária. Mas ao mesmo tempo, é absolutamente incontestável admitir que o barramento dos rios com fins hidroelétricos descaracterizou províncias faunísticas, ameaçando a conservação e a biodiversidade da ictiofauna das várias regiões brasileiras (CAROSFELD et al., 2003; DUKE ENERGY – GERAÇÃO PARANAPANEMA, 2003).

A construção de barragens exige adoção de medidas que reduzam os impactos sobre as populações de peixes durante e após a formação do reservatório. Várias ações têm sido utilizadas para preservar essa fauna em rios “divididos” por barragens. Algumas, como construir escadas de transposição e elevadores de peixes, transportar (em veículos) os peixes da área abaixo da barragem para o reservatório ou mesmo implantar estações de piscicultura para reproduzir espécies nativas para futuros repovoamentos, têm sido testadas em todo o mundo (AGOSTINHO et al., 2002; HILSDORF; PETRERE, 2002; FERNANDEZ; AGOSTINHO; BINI, 2004).

O sucesso das escadas na transposição de cardumes de salmão na América do Norte estimulou os legisladores brasileiros a produzirem o primeiro documento legal importante relacionado ao assunto no Brasil. Isto é, a Lei nº. 2250, do Estado de São Paulo (28/12/1927), que em seu Artigo 16 tornava obrigatória a instalação de escadas para transposição de peixes em todas as barragens daquele estado. A partir de então outros documentos ligados à proteção da fauna aquática foram produzidos. Em 1934, por exemplo, uma lei federal ampliou a obrigatoriedade das escadas para o país. Em 1938, nova lei determinava que as barragens devessem ter mecanismos que permitissem a preservação da ictiofauna, pela

construção de escada de peixes ou estação de piscicultura. Dados os resultados insatisfatórios das escadas, as concessionárias hidrelétricas passam a construir essas estações e a contratar pessoal efetivo à piscicultura. Em 1967, o Decreto-Lei nº. 221 (28/02/1967) delegou à Superintendência para o Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE) a tarefa de determinar o melhor mecanismo para a proteção da fauna aquática. A SUDEPE, que tinha por principal finalidade o desenvolvimento da aqüicultura, tornou obrigatória, por meio da Resolução 46 (27/01/1971), a construção de uma estação de piscicultura em cada sub-bacia, onde reservatórios fossem construídos (ALZUGUIR, 1994).

Em 1977 foi determinado pela antiga Superintendência do Desenvolvimento da Pesca (hoje incorporada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), que qualquer entidade envolvida na construção de barragens deve adotar sistemas ou métodos de proteção e conservação dos recursos biológicos aquáticos: “todos quantos, para qualquer fim, represarem as águas dos rios, ribeirões e córregos, são obrigados a construir escadas que permitam a livre subida dos peixes”. Ao se generalizar a obrigatoriedade de uma obra, cujo funcionamento resulta de interações entre suas características técnicas (tipo, declividade, vazão, posição em relação ao eixo da barragem etc.) e a natureza da ictiofauna presente, sem o necessário conhecimento técnico-científico do empreendimento ou dos peixes, incorreu-se no risco de insucesso e desperdício de recursos, esforços e oportunidades. A partir da criação do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA - Lei 6.938/81) e da instituição da obrigatoriedade do Relatório de Impactos Ambientais, em 1983 - que deveria incluir levantamentos da área, descrição das ações propostas e alternativas, identificação, análise e predição dos principais impactos positivos e negativos, a decisão em relação às ações de mitigação de impactos passou a ser prevista nesse documento (HILSDORF; PETRERE, 2002).

Segundo Agostinho e Gomes (2005) as escadas para transposição de peixes são mecanismos que permitem aos peixes migradores a transposição da barragem durante o período reprodutivo. De acordo com Zocchi (2002) a eficácia deste sistema é limitada, funcionando apenas na subida, considerando que no alto os peixes encontrem locais apropriados de desova em lagoas ou remansos para o crescimento de alevinos. No entanto, estes peixes precisam voltar como parte do seu ciclo natural e, portanto, guiam-se pela correnteza, contudo estes peixes não

conseguem achar a escada no meio da represa, de modo que poucos peixes conseguem concluir seu ciclo reprodutivo.

Reforçando esta hipótese Agostinho e Gomes (2005) colocam como uma questão de grande importância, aquela que se refere ao recrutamento de peixes à jusante. Pois mesmo que as escadas ou elevadores possibilitem a transposição da barragem pelos reprodutores de várias espécies de peixes, parece pouco provável que a prole fará o movimento oposto. Embora faltem dados precisos sobre esse assunto, é esperado que as escadas subtraiam do estoque da jusante um grande número de reprodutores, não promovam sua reposição pelo recrutamento e tenham benefícios duvidosos quanto à manutenção dos estoques do trecho à montante, especialmente quando inexitem áreas relevantes de várzeas (criadouros naturais). Segundo Levin e Schiawe (2001) esta subtração de reprodutores no estoque à jusante exerceria uma pressão de seleção sobre a variabilidade ou diversidade genética desse estoque, e por outro lado exerceria uma forte força seletiva em favor das espécies não migradoras.

Embora não haja dúvida quanto à habilidade de muitas espécies migradoras em ascenderem às escadas, mesmo com alturas de 20 metros ou mais e alcançarem o reservatório, a seletividade das escadas à transposição da barragem é consenso nos estudos realizados. Alguns indicadores mostram que essas obras teriam eficiência duvidosa na preservação ou conservação dos estoques em um cenário de barragens em série, como o da bacia do rio Paraná (BORGHETTI et al., 1994; AGOSTINHO et al., 2002; AGOSTINHO; GOMES, 2005).

Além disso, Agostinho et al. (2002) afirmam que uma das principais limitações das escadas de transposição parecem ser os mecanismos de atração dos peixes, de modo que, se a entrada não é prontamente reconhecida, os peixes podem permanecer na vizinhança por um tempo prolongado, atrasando a migração e comprometendo a desova, ou até mesmo nunca acessarem a escada. Assim, a localização das escadas é de extrema importância, tendo que se levar em conta a sua proximidade a outros componentes da represa como os vertedouros e as entradas de água pelas turbinas, evitando que os peixes sejam erroneamente atraídos a estes componentes, quando deveriam se direcionar a entrada da escada.

Os mesmos autores relatam que existem na literatura alguns resultados satisfatórios quanto à utilização de escadas para a transposição, no entanto, não avaliam a efetividade desta ascensão na preservação dos estoques na

bacia. Assim, Agostinho et al. (2002) consideram de extrema importância que a construção de escadas seja precedida por uma ampla avaliação de sua eficiência na manutenção dos estoques, e da possibilidade destas causarem impactos negativos à jusante, já que este processo envolve altos investimentos financeiros.

1.1.4 Variabilidade genética, estrutura populacional, manejo e conservação de peixes

A variação genética é originada quando um alelo muta para outro, ou seja, a fonte principal da variabilidade gênica é a mutação. Esta variação mutacional se instala e é moldada por forças evolutivas. Por força da seleção natural, mutantes com sobrevivência e habilidades prejudicadas aumentam e diminuem de frequência, respectivamente; já por forças aleatórias, como a deriva genética, mutantes que não são melhores ou piores que outros na população são seletivamente neutros e podem ao acaso terem suas frequências aumentadas ou diminuídas (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

A presença de variabilidade genética herdável nas características adaptativas fornece uma flexibilidade fenotípica a novas mudanças ambientais, o que a torna uma característica intrínseca fundamental resultando na manutenção da espécie a longo prazo (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Segundo esses autores, a variabilidade genética é composta por três elementos principais: diversidade genética (a quantidade de variação genética que possui a espécie ou grupo de organismos); diferenciação genética (distribuição da variação genética entre populações) e distância genética (quantidade de variação genética que existe entre pares de populações).

Como já descrito, a diversidade genética dentro de uma população pode ser reduzida através de dois processos principais: seleção natural de traços adaptativos ou deriva genética (NIELSEN, 1998). Quando as populações sofrem uma diminuição brusca do seu tamanho efetivo (*bottleneck* ou gargalo de garrafa), ou quando esta coloniza novos territórios com um pequeno número efetivo (efeito fundador), o papel desempenhado pela deriva genética é de importância particular na alteração de frequências alélicas e no perfil genético das futuras gerações porque

o número de indivíduos da recente população é naturalmente menor que o da população original, potenciando o efeito da deriva genética (HARTL; CLARK, 1997). Este efeito em aquicultura é observável na constituição do estoque de progenitores, que constitui uma amostra ínfima da população natural (CASTILHO, in prep.).

Compreender os efeitos da variabilidade genética é de fundamental importância para entender como a diversidade é distribuída entre populações, ou seja, a proporção relativa de variabilidade genética contida entre e dentro de populações (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Métodos genéticos de manejo, conservação e criação de peixes, por exemplo, são dependentes do conhecimento da quantidade de variação dentro de uma unidade local reprodutiva (CARVALHO, 1993).

A variabilidade genética, também chamada de biodiversidade molecular, além de importante para a evolução, pode ser usada como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversos ramos como, por exemplo, para verificar as afinidades e os limites entre as espécies, para detectar modos de reprodução e estruturação familiar, para estimar níveis de migração e dispersão nas populações, entre outros (SOLÉ-CAVA, 2001). Assim, fica claro que em estudos populacionais visando manejo e conservação de peixes e outros organismos é fundamental o prévio conhecimento da distribuição desta variabilidade genética.

A estruturação populacional é quase universal entre os organismos, pois muitos formam naturalmente, subpopulações agregando-se de diversas formas. Além disso, os habitats são naturalmente irregulares, compostos por áreas favoráveis misturadas com áreas desfavoráveis, e ao longo do tempo, mesmo áreas uniformemente favoráveis podem ser interrompidas por diferentes formas de barreiras (HARTL; CLARK, 1997). Estes mesmos autores ressaltam que se existe subdivisão populacional, há inevitavelmente alguma diferenciação entre as subpopulações; sendo a diferenciação genética entendida por eles como a aquisição de frequências alélicas que diferem entre as subpopulações.

Avaliações da estrutura genética populacional fornecem um retrato genético contemporâneo das populações permitindo o conhecimento da taxa de endogamia, diversidade genética, diferenciação entre os espécimes, entre outras informações importantes para a elaboração de planos de manejo (PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003). Por sua vez, o manejo tem por finalidade principal a implementação de medidas sobre um sistema visando otimizá-

lo de acordo com um objetivo específico. Por exemplo, no caso do manejo de recursos pesqueiros, procura-se integrar informações ecológicas, econômicas, políticas e sócio-culturais, na tentativa de implementar alternativas que permitam a consonância entre as aspirações e necessidades da sociedade com a utilização dos recursos aquáticos, procurando melhorar tais recursos e sua utilização (cf. AGOSTINHO; GOMES, 2005).

Os aspectos que possuem maior relevância no sentido de manter as populações abaixo de limiares demográficos e genéticos que seriam críticos à reprodução e aos processos evolutivos necessários à existência a longo prazo seriam, a destruição, a contaminação e/ou fragmentação do hábitat, a exploração excessiva e o endocruzamento. Assim, é inegável a importância do manejo dos recursos naturais, porém a falta de informações sobre o sistema a ser manejado, a ausência ou inadequação de monitoramento e a elevada abundância dos recursos e sua variabilidade, muitas vezes interferem na eficiência do processo (AGOSTINHO; GOMES, 1997).

O conhecimento prévio da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de uma espécie por meio de marcadores moleculares é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento do manejo e conservação *in situ* e de repovoamento. Para isso, deve-se levar em conta se uma espécie está distribuída como apenas uma população ou como populações geneticamente diferentes e qual o grau de interação entre elas. No caso dos peixes de água doce, suas populações em geral se distribuem por locais isolados, o que pode minimizar as trocas gênicas entre elas, levando a processos de diferenciação genética (HILSDORF; PETRERE, 2002).

1.1.5 Marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) o desenvolvimento das técnicas modernas de biologia molecular propiciou o surgimento de diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA. Os mesmo autores ressaltam ainda que a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLINS; FALOONA, 1987) foi utilizada diretamente em muitos trabalhos

científicos e que técnicas derivadas dela têm sido amplamente publicadas e utilizadas desde sua descrição. Estes trabalhos têm permitido avanços tanto em áreas básicas como naquelas que buscam o entendimento de processos biológicos fundamentais, como em áreas aplicadas, dentre as quais estão as identificações de genótipos, diagnóstico de doenças, estudos filogenéticos, de melhoramento e conservação, abrangendo todos os grupos de seres vivos (GOULÃO et al., 2001; XU et al., 2003; STOW; BRISCOE, 2005).

Um dos aspectos mais relevantes da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. Entretanto, esta técnica apresentava uma limitação, a construção de *primers* para a amplificação dependia do conhecimento prévio das seqüências franqueadoras do fragmento de DNA de interesse (cf ALMEIDA, 2002).

A técnica de RAPD foi primeiramente desenvolvida em 1990 (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990) e consistia na amplificação de segmentos do DNA nuclear por meio de pequenos *primers* aleatórios. Devido ao reduzido tamanho e à baixa temperatura de anelamento desses *primers* tornou-se grande a probabilidade de serem amplificados fragmentos múltiplos por meio desta técnica molecular. Tais locos amplificados na maioria das vezes são seletivamente neutros, já que nos vertebrados, uma grande proporção de genoma é não codificante (LIU; CORDES, 2004).

Os marcadores RAPD utilizam um *primer* único e curto com cerca de 10 a 11 nucleotídeos para dirigir a reação de amplificação de vários segmentos de DNA simultaneamente, em diversos pontos do genoma. O número de locos obtidos por essa metodologia é ilimitado, uma vez que diversos *primers* podem ser utilizados e as seqüências internas desses fragmentos vão desde seqüências de cópia única até altamente repetitivas, o que dá um aumento na variação genética (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004).

A possibilidade de se obter um grande número de marcadores genéticos sem qualquer informação prévia sobre a genética do organismo, a rapidez e simplicidade na aquisição dos dados, o baixo custo e acessibilidade desta tecnologia têm sido os principais fatores que levaram à sua rápida adoção por diversos grupos de pesquisa no mundo (TORRES; MATOSO; ARTONI, 2004). Além disso, a técnica não é invasiva, sendo necessárias apenas pequenas quantidades

de tecido para análise, o que possibilita a utilização deste marcador para espécies ameaçadas (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004).

Polimorfismos de fragmentos de RAPD são visualizados como presença e ausência de bandas em um gel de eletroforese e podem assim ser facilmente interpretados e convertidos em dados diagnósticos de homologia molecular entre indivíduos. Esta técnica possibilita detectar níveis de polimorfismos do DNA e conseqüentemente pode produzir marcadores genéticos espécie-específicos (TORRES; MATOSO; ARTONI, 2004).

No entanto, a principal limitação do marcador RAPD é sua característica dominante, onde a presença da banda ocorre tanto para os genótipos homozigotos como para heterozigotos (Figura 5), sendo difícil distinguir um genótipo do outro através da intensidade da banda produzida (ALI et al., 2004; LIU; CORDES, 2004; LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Alguns modelos estatísticos foram desenvolvidos no sentido de contornar as limitações, permitindo a estimativa de parâmetros populacionais com a utilização de marcadores dominantes (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992; LYNCH; MILLIGAN, 1994). De acordo com tais modelos, deve-se assumir que os alelos dos diferentes locos não co-migram para a mesma posição em um gel e que os grupos populacionais estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (LYNCH; MILLIGAN, 1994).

Atualmente, o marcador RAPD está sendo amplamente utilizado para estudos genéticos em diversas classes de organismos, como alguns trabalhos citados a seguir. Meyer, Garcia e Souza (2004) utilizaram os marcadores RAPD e AFLP para comparar diferentes coeficientes de similaridade em milho (*Zea mays*). Os mesmos marcadores foram empregados por Díaz, Muniz e Ferrer em 2001 para estimar índices de variação genética em populações de *Pinus oocarpa* da Nicarágua; por Kjolner et al. (2004) para estimar a diversidade clonal em *Saxifraga cernua*, e por Bagley, Anderson e May (2001) que avaliaram o polimorfismo e a reprodutibilidade desses marcadores como parâmetro para a estimativa de impactos ambientais. Lougheed et al. (2000) compararam os resultados obtidos com os marcadores RAPD e microssatélites em um estudo populacional da espécie *Sistrurus c. catenatus* (cobra cascavel).

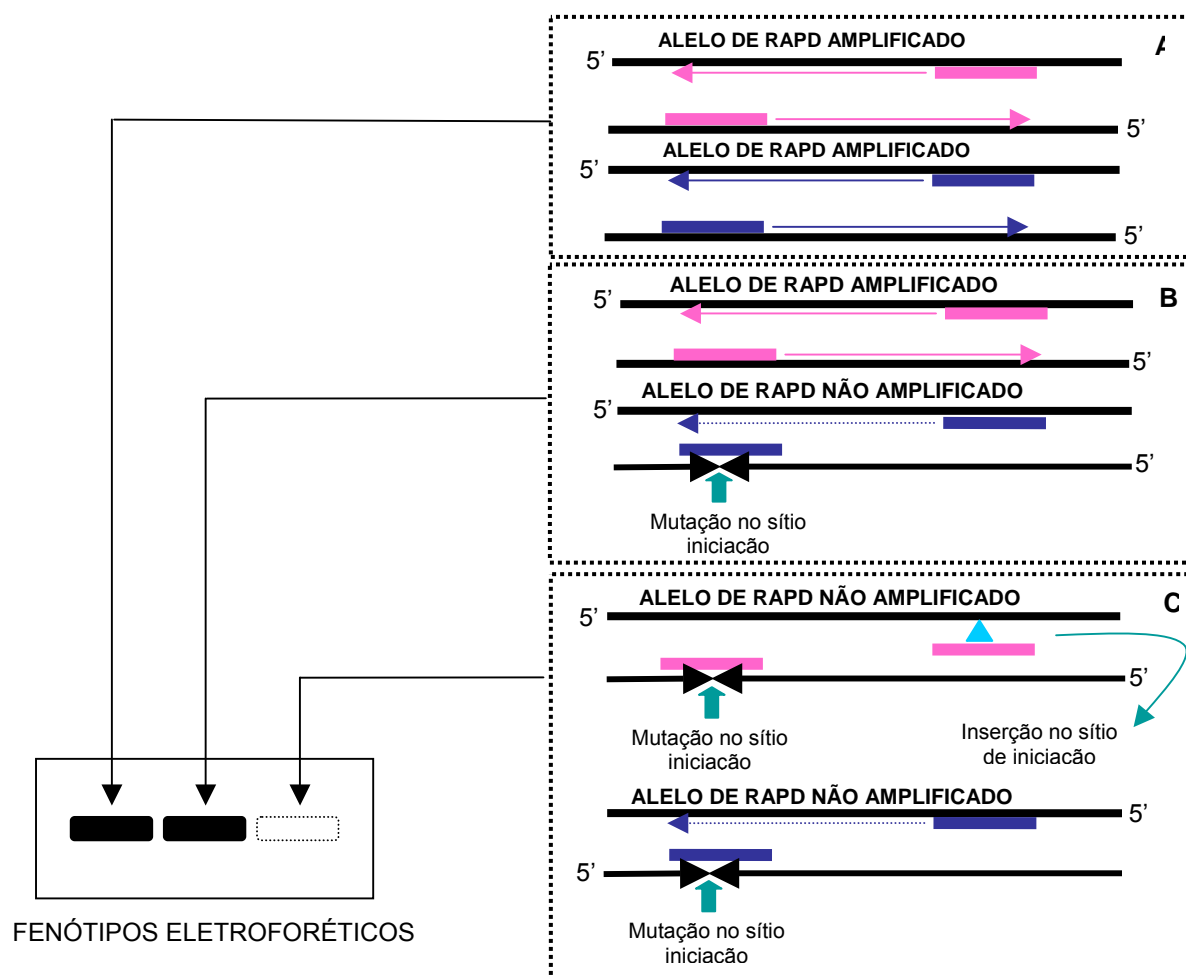


Figura 5 – Comportamento “dominante” de marcadores RAPD. Os painéis ilustram a correspondência que existe entre fenótipos RAPD no gel de eletroforese e respectivos genótipos. O fenótipo “presença de banda” (painéis A e B) pode corresponder a dois genótipos diferentes (homozigotos e heterozigotos). O painel C ilustra causas de fenótipo nulo (ausência de banda). Fonte: Figura modificada de FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998.

Em 2004, Torres; Matoso e Artoni apresentaram uma revisão bibliográfica sobre as metodologias básicas de estudo na área de biologia molecular, frente às tendências gerais de análise em biologia evolutiva de peixes de água doce na região tropical. E em um estudo similar, Ali et al. (2004) publicaram uma revisão bibliográfica abrangendo a aplicação dos marcadores RAPD em peixes. Tais autores concluíram que a técnica de RAPD é eficiente na detecção de polimorfismo dentro e entre diferentes populações de peixes e, portanto, muito eficaz no estabelecimento de relações genéticas entre estas populações.

A eficácia desses marcadores em estudos populacionais e de diversidade genética em peixes tem contribuído para o aumento de sua utilização, o que tem levado à publicação de vários estudos nesta área, como por exemplo, os de: Chiari e Sodré (2001) que utilizaram o marcador RAPD na avalia o de oito espécies da família Anostomidae; Sekine et al. (2002) que empregaram os marcadores RAPD para estudar a diferencia o genética de popula es de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) isoladas pelos Saltos de Sete Quedas; Oliveira et al. (2002) que estudaram a diversidade e distância genética de popula es de *Steindachnerina* no Alto rio Paraná; Wasko e Galletti Jr. (2002) que estimaram, por meio do marcador RAPD, a diversidade genética de *Brycon lundii* e suas implica es para a conserva o desta espécie; Prioli et al. (2002) na identifica o de popula es de *Astyanax altiparanae* do rio Iguaçu; Hatanaka e Galetti Jr. (2003) que utilizaram o marcador RAPD para averiguar a ocorrência de popula es diferenciadas de espécie de peixes migradores de água doce; Barman et al. (2003) que estudaram as rela es genéticas entre quatro espécies de carpas Indianas (*Labeo rohita*) por meio do marcador RAPD; Bartfai et al. (2003) que utilizaram os marcadores RAPD e microsatélite para análises genéticas de dois estoques de carpas comuns; Islam e Alam (2004) que analisaram por meio do marcador RAPD quatro popula es de carpas (*Labeo rohita*) e suas rela es genéticas; Hassanien et al. (2004) que estimaram a diversidade genética de popula es da tilápia do Nilo por meio do marcador RAPD; Almeida, Sodré e Contel (2003) analisaram a estrutura populacional de *Pimelodus maculatus* provenientes de diferentes localidades do rio Tietê e Paranapanema; e Leuzzi et al. (2004) que, utilizando o marcador RAPD, avaliaram a estrutura genética e *Astyanax altiparanae* provenientes de reservatórios do rio Paranapanema.

1.1.6 Marcadores Microsatélites (SSR - Simple Sequence Repeats)

Diferentes estudos no início dos anos de 1980 demonstraram que os genomas de todos os eucariotos analisados são densamente povoados por seq ncias simples repetidas (SSR – denominadas microsatélites), ocorrendo, nos peixes, a cada 10kb. Estas pequenas seq ncias possuem de 2 a 6 nucleotídeos de

comprimento e são repetidas em *tandem*, estando presentes tanto nas regiões codificantes como nas não-codificantes (SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1992; LIU; CORDES, 2004). Segundo Chistiakov, Hellemans e Volckaert (2006 in press) os microssatélites geralmente são considerados marcadores moleculares neutros, no entanto, diversos trabalhos têm provado a funcionalidade de um número significativo de SSRs. Estas seqüências estariam envolvidas na manutenção da estrutura do DNA, nos processo de replicação e recombinação do DNA, e expressão gênica.

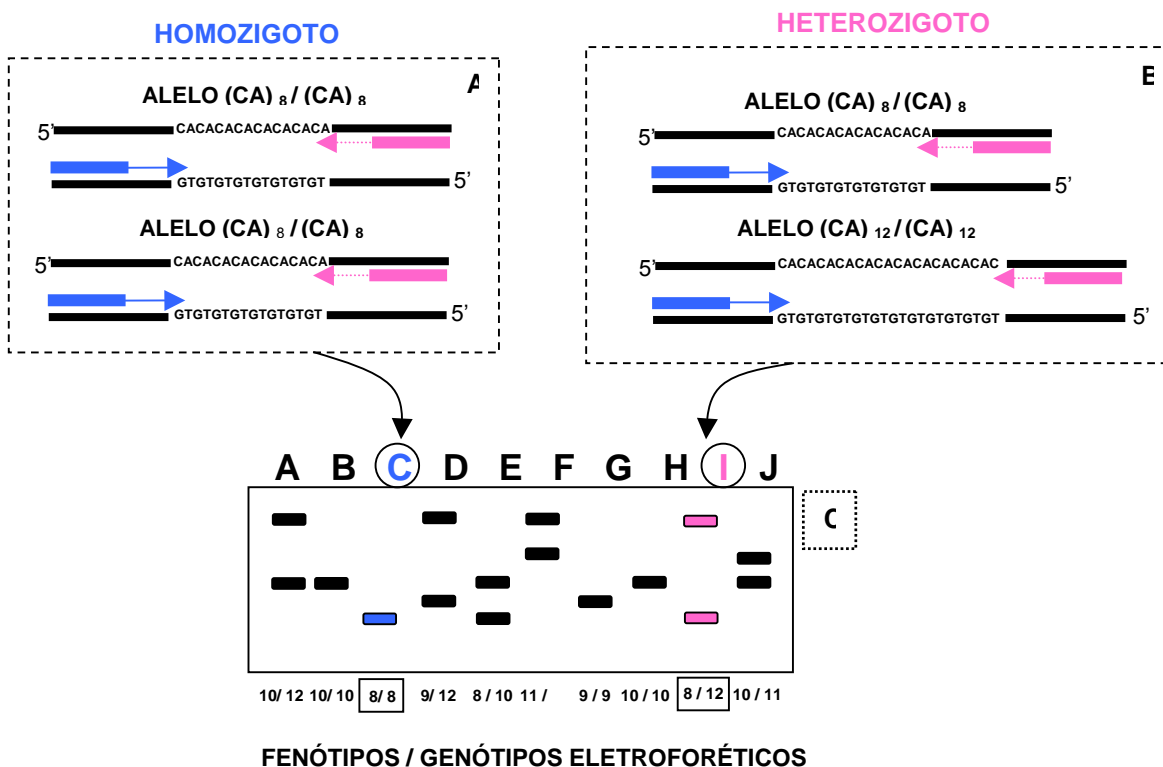
É característica dos microssatélites a conservação das seqüências flanqueadoras o que possibilita a construção de *primers* para amplificar por PCR estas regiões repetitivas, dispensando a necessidade de isolamento e caracterização das mesmas (PRESA; GUYOMARD, 1996; O'CONNELL; DILLON; WRIGHT, 1998).

Os microssatélites representam regiões instáveis do genoma, sofrendo mutações numa porcentagem muito maior que as observadas nas seqüências não-repetitivas de DNA (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Segundo Liu e Cordes (2004) a alta taxa de mutação apresentada pelos marcadores microssatélites se deve a erros (*slippage*) da enzima DNA polimerase durante o processo de replicação, o que gera alelos com diferentes números de unidades repetidas.

O sucesso dos marcadores microssatélites se deve a sua abundância, sua grande distribuição no genoma, a detecção de alto grau de polimorfismo e a facilidade de análise (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Além disso, tais marcadores obedecem à herança mendeliana simples e são considerados co-dominantes (Figura 6) sendo possível à identificação dos heterozigotos (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Estes fatores combinados ao multialelismo dos microssatélites os colocam como marcadores moleculares com maior conteúdo de informação de polimorfismo (LIU; CORDES, 2004).

Estudos populacionais envolvendo diversos organismos estão sendo desenvolvidos utilizando os marcadores microssatélites, como por exemplo, o estudo de Curtis e Taylor (2003) que investigaram por meio destes marcadores a estrutura genética de salamandras gigantes em uma floresta desmatada. Lemes et al. (2003) estudaram a estrutura genética e populacional da espécie *Swietenia macrophylla*, uma árvore proveniente da Amazônia, e sua implicação para conservação da espécie. Garner, Angelone e Pearman (2003) estimaram a depleção genética e suas

implicações na conservação de populações de *Rana latastei* (uma espécie de sapo). Zhou, Xie e Ge (2003) utilizaram tais marcadores para analisar a diversidade genética e estrutura genética populacional de *Oryza rufipogon* (uma espécie de arroz selvagem) na China.



FONTE: Figura modificada de FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998.

Figura 6 – Base genética e detecção de polimorfismos de microssatélites. Painéis A e B ilustram genótipos homozigoto (alelos iguais) e heterozigoto (alelos diferentes) para uma região genômica que compreende um microssatélite de elementos (CA)/(GT). Painel C ilustra um gel de eletroforese com diferentes genótipos homozigotos (banda única) e heterozigotos (duas bandas) em indivíduos diplóides.

Em peixes, polimorfismos de marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados em diferentes tipos de estudos: variabilidade genética e estrutura de populações naturais do robalo Europeu, (*Dicentrarchus labrax*), coletados em diferentes locais (GARCIA DE LEÓN; CHIKHI; BONHOMME, 1997); para estimar a diferenciação genética entre duas populações de salmão que colonizaram diferentes ambientes reprodutivos (HENDRY et al., 2000); para

examinar a estrutura populacional de *Lethrinus miniatus* em corais australianos (HERWERDEN, BENZIE, DAVIES, 2003), para estimar a estrutura genética e populacional da truta marrom (*Salmo trutta*) (RUZZANTE; HANSEN; MELDRUP, 2001); para averiguar os efeitos genéticos da construção de barragens para a espécie *Salvelinus confluentus*, entre outros. Os diversos trabalhos que utilizam microsatélite na investigação de diversidade e estrutura genética em peixes refletem a grande eficácia destes marcadores para estudos genéticos populacionais nesses organismos.

Devido à ampla utilização dos locos de microsatélite em estudos das mais diversas áreas, o isolamento destas seqüências tem se tornado uma prática abundante no meio científico. Hatanaka, Henrique-Silva e Galleti Jr. (2002) isolaram um loco de microsatélite pentanucleotídico (AATTT)_n para o gênero *Prochilodus* denominado *pl 1*, estudos citogenéticos por meio de hibridização *in situ* indicaram que esta seqüência provavelmente tem natureza telomérica. As análises de polimorfismo para três espécies do gênero (*P. marggravii*, *P. lineatus* e *P. affinis*) revelaram 11 alelos diferentes. A descrição deste loco pode vir a contribuir com estudos de estrutura genética para diversas espécies do gênero *Prochilodus*, entre elas *P. lineatus* que foi analisada no presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

As dificuldades de implantação das escadas de transposição de peixes e da verificação da eficiência destas, levam ao objetivo deste programa de monitoramento genético: estudar a estrutura genética de *Prochilodus lineatus*, no Complexo Canoas, uma espécie de grande importância econômica, comprovadamente migradora e, portanto vulnerável a alterações de habitats.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A análise genética desta espécie foi baseada em marcadores moleculares de RAPD e microssatélites, tendo por objetivos específicos:

- Quantificar a variabilidade genética de espécimes capturados nas escadas de transposição das UHEs de Canoas I e Canoas II durante as piracemas dos anos de 2003, 2004 e 2005.
- Realizar análise comparativa, através de diferentes parâmetros genéticos, entre os espécimes coletados na escada de transposição de peixes de Canoas I durante as diferentes piracemas, bem como entre os da escada de transposição de Canoas II, para verificar a possível existência de cardumes com estrutura genética diferente.
- Realizar análise comparativa, através de diferentes parâmetros genéticos, entre os espécimes coletados nas escadas de transposição de peixes de Canoas I e Canoas II, com a finalidade de observar se há diferença genética entre os espécimes que transpõem cada uma das escadas na mesma piracema.
- Estabelecer parâmetros verificadores da eficácia das escadas de transposição de peixes na manutenção da diversidade genética dos estoques dos reservatórios;

Espera-se com estes objetivos a obtenção de dados capazes de ajudar na avaliação da real efetividade das escadas de transposição de peixes na manutenção da diversidade genética dos estoques naturais de *Prochilodus lineatus*.

**ARTIGO A SER ENVIADO PARA O PERIÓDICO
BIODIVERSITY AND CONSERVATION**

**ANÁLISE DO IMPACTO DE ESCADAS DE TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES NA
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Prochilodus lineatus* (PISCES,
CHARACIFORMES) NO RIO PARANAPANEMA – BRASIL.**

Francine Matias de Paula ¹, Fernanda Simões de Almeida ¹, Mário Luís Orsi ²,
Sandro Geraldo de Castro Britto ³, Leda Maria Koelblinger Sodré ^{1*}.

¹ Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina

² Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina

³ Duke Energy International – Geração Paranapanema

Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid – PR 445 - Km 380 - Campus Universitário

Cx. Postal – 6001 CEP - 86051-990

Londrina – PR – BRASIL.

Telefone: 55-43-3371-4437

E-mail: leda@uel.br

* Autor Correspondente.

ABSTRACT

The aim of this work was to contribute to our understanding of the effects of fish passage ladders on the genetic diversity of fish by conducting genetic study of the population structure of the species *Prochilodus lineatus* collected in the passage ladders of Canoas I and Canoas II - Paranapanema River (Brazil) utilizing the RAPD and microsatellite techniques. Analyses with both markers indicated a high genetic variability ($\bar{P} \approx 70\%$ and $\bar{H}_o \approx 67\%$) and low genetic differentiation ($F_{ST} = 0.0324$ and $F_{ST} = 0.0017$, for RAPD and microsatellite, respectively) among the groups of *P. lineatus* collected at each passage ladder. The various parameters of genetic diversity determined indicated the existence of a single population of *P. lineatus* in the Canoas Complex originating from the Capivara Reservoir (downstream from Canoas I), probably fed by the Tibagi and Cinzas Rivers. In view of the findings that indicated that after passage there is no completion of the reproductive cycle, the presence of the fish passage ladders in the Canoas Complex can be considered impacting, where they cause a depletion in the recruitment downstream, which in the long term can compromise the natural population of *P. lineatus* in the middle of the Paranapanema River.

Key words: fish, neotropical, population structure, microsatellite, RAPD.

1. INTRODUÇÃO

O processo de construção de barragens e conseqüente formação de reservatórios para fins hidroelétricos conduzem a alterações das características físicas, químicas, sanitárias e biológicas do rio. Modificando a intensidade, a duração e época das cheias, reduzindo os nutrientes disponíveis e as áreas sazonalmente alagáveis, criando nos segmentos imediatamente abaixo, condições térmicas e hidrodinâmicas muito instáveis. Além disso, a construção de barragens intercepta a migração de diversas espécies causando impactos sobre a capacidade biogênica do sistema, disponibilidade de alimento e abrigo para formas jovens de peixes (Thomaz et al. 1997).

Os peixes migradores, portanto, são particularmente sensíveis aos efeitos prejudiciais das represas hidroelétricas, já que estas variações atuam sobre o sucesso reprodutivo. No Brasil muitas das populações destes peixes se mostram em rápido declínio, podendo, num futuro próximo, ter sua sobrevivência comprometida (Agostinho et al. 1992; Carosfeld et al. 2003).

A espécie *Prochilodus lineatus* pertence à ordem Characiformes, subordem Characoidei e família Prochilodontidae, são peixes migradores e reofílicos (peixes de piracema), devem migrar contra a correnteza dos rios para os estímulos sexuais e necessitam de ambientes lóticos para desova. Possuem periodicidade reprodutiva sazonal com picos (novembro – fevereiro), fecundação externa, desova total, alta fecundidade, não demonstrando cuidado com a prole (Godoy 1975; Vazzoler 1996; Paiva et al. 2002; Castro e Vari 2003; Orsi 2005). *Prochilodus lineatus* é uma espécie de interesse para aquicultura devido a seu hábito alimentar (iliófago), à alta fecundidade e ao bom desempenho zootécnico (Ramagosa et al.

1985; Kunkel e Flores 1994). De acordo com Castro e Vari (2003), essa espécie é ainda altamente abundante nos rios Paraná, La Plata e Uruguai, tendo uma grande representação pesqueira.

Os poucos trabalhos encontrados sobre variabilidade genética e estrutura populacional de *P. lineatus* (Revaldaves et al. 1997; Sivasundar et al. 2001; Zenatti 2003) indicam a importância de estudos para obtenção de mais informações a respeito da estrutura de populações e diversidade genética dessa espécie, a fim de que, programas de conservação possam ser melhores delineados.

O rio Paranapanema tem sua nascente na Serra de Paranapiacaba localizada na Mata Atlântica do município de Capão Bonito (SP), percorrendo cerca de 660 km com orientação geral a noroeste é um importante afluente da margem esquerda do rio Paraná e faz parte da Bacia do Alto Paraná – Brasil. Ao longo dessa extensão apresenta um desnível de 542 m, afluindo no rio Paraná entre os municípios de Rosana (SP) e Marilena (PR). Sua área de drenagem abrange uma superfície em torno de 109.600 km², estabelecendo uma divisa natural entre os estados de Paraná e São Paulo. Atualmente existe no rio Paranapanema 10 usinas hidrelétricas formando um sistema de reservatórios em cascata. A área que foi contemplada pelo presente estudo é a que abrange as Usinas Hidrelétricas (UHE) de Canoas I e Canoas II (Complexo Canoas) médio Paranapanema, Essas são às únicas UHEs nas quais foram construídas escadas de transposição de peixes, com o intuito de minimizar o impacto do represamento na manutenção dos estoques naturais da bacia (Duke Energy – Geração Paranapanema, 2003) .

De acordo com Agostinho e Gomes (2005), as escadas de transposição de peixes vêm sendo construídas em alguns reservatórios em função das leis implementadas no país, no entanto, após sua construção, avaliações

sistemáticas e abrangentes não têm sido realizadas nesses empreendimentos, de modo que dados sobre a verdadeira efetividade deste mecanismo e a importância dessa transposição para a preservação dos estoques naturais ainda são desconhecidos.

Embora não haja dúvida quanto à habilidade de muitas espécies migradoras em ascenderem às escadas, mesmo com alturas de 20 metros ou mais e alcançarem o reservatório, a seletividade das escadas à transposição da barragem é consenso nos estudos realizados. Alguns indicadores mostram que essas obras teriam eficiência duvidosa na preservação ou conservação dos estoques em um cenário de barragens em série, como o da bacia do rio Paraná (Borghetti et al. 1994; Agostinho et al. 2002; Agostinho e Gomes 2005).

Sabendo que a existência de barreiras geográficas, como barragens, isola populações, fica claro que em longo prazo tais empreendimentos poderão causar a redução do fluxo gênico, mudanças significativas nas frequências alélicas, polimorfismos intraespecíficos, e conseqüentemente a diminuição da variabilidade genética entre estas populações (Agostinho et al. 2002; Hatanaka e Galetti 2003).

Segundo Lowe et al. (2004), a variabilidade genética é composta por três elementos principais: diversidade genética (a quantidade de variação genética que possui a espécie ou grupo de organismos); diferenciação genética (distribuição da variação genética entre populações) e distância genética (quantidade de variação genética que existe entre pares de populações).

Avaliações da estrutura genética populacional fornecem um retrato genético contemporâneo das populações permitindo o conhecimento da taxa de endogamia, diversidade genética, diferenciação entre os espécimes entre outras

informações importantes para a elaboração de planos de manejo (Perez - Sweeney et al. 2003).

Nesse contexto, de identificação da diversidade e estrutura genética é que estão sendo aplicados os marcadores genéticos e moleculares nas espécies de peixes neotropicais, buscando, inclusive, a exploração de características de interesse econômico, bem como a preservação de unidades evolutivamente significativas para a manutenção dessa biodiversidade (Torres et al. 2004).

O conhecimento prévio da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de uma espécie por meio de marcadores moleculares é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento do manejo e conservação *in situ* e de repovoamento. Para isso, deve-se levar em conta se uma espécie está distribuída como apenas uma população ou como populações geneticamente diferentes e qual o grau de interação entre elas. No caso dos peixes de água doce, suas populações em geral se distribuem por locais isolados, o que pode minimizar as trocas gênicas entre elas, levando a processos de diferenciação genética (Hiltsdorf e Petrere 2002).

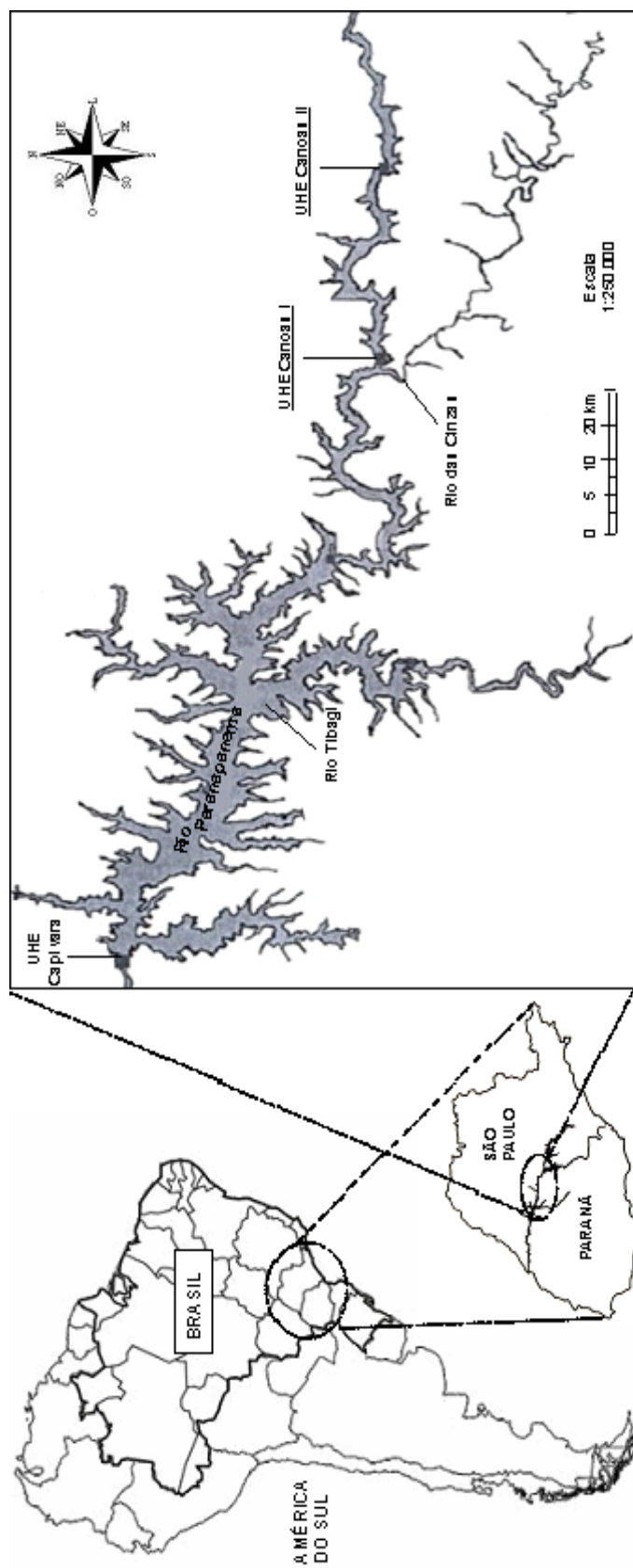
Neste estudo foram utilizadas as técnicas de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*) para avaliar a diversidade genética e estrutura populacional de *Prochilodus lineatus* coletados durante a piracema nas escadas de transposição das UHEs de Canoas I e II. A obtenção destes dados visa contribuir para o conhecimento da efetividade das escadas de transposição de peixes na preservação dos estoques naturais e redução do impacto ambiental causado pela construção de barragens.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

As coletas de *P. lineatus* foram realizadas nas escadas de transposição das UHEs de Canoas I (50° 31'W e 22° 56'S) e Canoas II (50° 15'W e 22° 56'S), no médio rio Paranapanema (Figura 1).

As coletas foram feitas no período de Março de 2003 a Março de 2005, sempre respeitando a época de piracema que abrange o começo de mês de setembro de um ano até o fim do mês de março do ano seguinte. O tecido muscular ou a nadadeira adiposa foram retirados de cada indivíduo. As amostras foram e armazenadas a - 20°C para posterior extração do DNA. Os espécimes coletados foram etiquetados e estão conservados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina.



FONTE: Modificado de Santos et al. (2005).

Figura 1 – Visão parcial do Rio Paranapanema e seus principais afluentes (rios Tibagi e das Cinzas). Em destaque, os dois locais de coleta: UHE Canoas I e UHE Canoas II.

2.2 Extração e quantificação de DNA

Para extração do DNA das amostras, foi utilizada a metodologia segundo Almeida et al. (2001). A quantificação do DNA foi estimada em fluorímetro *Dyna Quant 200 (Hoefler)* e a concentração das amostras foi padronizada para 5 ng/ μ L.

2.3 Marcadores RAPD

2.3.1 Reação de amplificação do DNA

Para cada amostra foi preparada uma mistura de reação de 15 μ L que continha: tampão de reação com 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl pH 8,3; 0,25 mM de dNTP (Invitrogen); 3,33 mM de $MgCl_2$; 0,33 μ M de *primer* (Operon Technologies); 0,75 U de Taq DNA Polimerase (EMBRAPA); 10 ng de DNA e água bidestilada para completar o volume. Além disso, foi preparada uma reação adicional sem DNA que foi utilizada como controle negativo.

A amplificação das amostras de DNA foi feita utilizando-se um termociclador (PTC-100, MJ Research) e seguiu um programa composto de uma desnaturação inicial a 92°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos, cada um contendo as seguintes fases: 40 segundos a 92°C (desnaturação), 1 minuto e 30 segundos a 40°C (pareamento) e 2 minutos a 72°C (extensão), sendo que após todos os ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Amostras de DNA de 5 indivíduos de *P. lineatus* foram utilizadas para a seleção de *primers* que tivessem a melhor qualidade e consistência no

padrão de bandas para o estudo da espécie em questão. Foram testados 40 *primers* dos kits OPAC, OPX, OPC e OPW (Operon Technologies). Foram selecionados 15 *primers*: OPW4, OPW5, OPW6, OPW7, OPW8, OPW9, OPAW10, OPW11, OPW18, OPC2, OPC7, OPX6, OPX17, OPAC6 e OPC15. Vale salientar que, por problemas eletroforéticos, o *primer* OPC7 não foi utilizado na análise genética de *P. lineatus* da escada de transposição de Canoas I.

2.3.2 Análise Eletroforética

Os produtos de RAPD foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4% em tampão TEB 0,5x, diluído da solução 10x (Tris 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M e EDTA 0,01M, pH 8,3). Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de 100 pb (Invitrogen). Foram mantidos 3 V/cm entre os eletrodos durante a corrida que se estendeu por aproximadamente 8 cm. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídeo (5 µL/mL), visualizado em transiluminador com luz ultravioleta e fotografado em filme preto e branco (T-MAX) e no sistema de fotodocumentação digital KODAK EDAS 290.

A análise eletroforética, para obtenção de perfis de RAPD de *P. lineatus* coletados na escada de transposição de Canoas I foi realizada com 46 espécimes divididos em 4 grupos conforme as respectivas datas de coleta (A - Mar. 2003; B - Nov. 2003; C - Dez. 2004 e D - Jan. 2005) que foram colocados lado a lado no mesmo gel. Para os grupos A, B foram utilizadas 14 amostras, para o grupo C, 13 amostras e para o grupo D foram utilizadas apenas 5 amostras devido à escassez de exemplares coletados no período de Janeiro de 2005.

Para a análise de *P. lineatus* provenientes da escada de transposição de Canoas II, foram utilizados 48 espécimes que também foram divididos em 4 grupos conforme a data de coleta (E - Dez. 2003; F - Dez. 2004; G - Jan. 2005 e H - Mar. 2005) colocados lado a lado no mesmo gel. Para todos os grupos foram utilizadas 12 amostras de *P. lineatus*.

Com a finalidade de se obter dados comparativos entre as populações de *Prochilodus lineatus* das duas escadas de transposição (Canoas I x Canoas II) foi realizada uma análise eletroforética comparativa, onde em um mesmo gel de agarose foram colocadas de 5 a 6 amostras de *P. lineatus* de todos os grupos de cada uma das escadas de transposição (A, B, C, D, E, F e G).

Os dados obtidos dos perfis eletroforéticos de RAPD foram introduzidos em programas de computador na forma de variáveis binárias (presença ou ausência de banda). Cada loco foi tratado como um sistema de dois alelos, com somente um dos alelos por loco sendo amplificado por PCR, também se assumiu que os alelos dos diferentes locos não co-migram para a mesma posição em um gel e que os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Lynch e Milligan 1994). As bandas que apareceram tanto no controle negativo quanto nas amostras, foram excluídas das análises. Para testar a repetibilidade dos padrões de banda obtidos foram preparadas, separadamente, duas reações de amplificação utilizando 4 amostras aleatórias de *P. lineatus*. Em seguida os produtos amplificados foram aplicados em géis diferentes e submetidos às mesmas condições eletroforéticas. Os perfis de bandas obtidos (Figura 2) foram comparados quanto à presença e ausência de bandas.

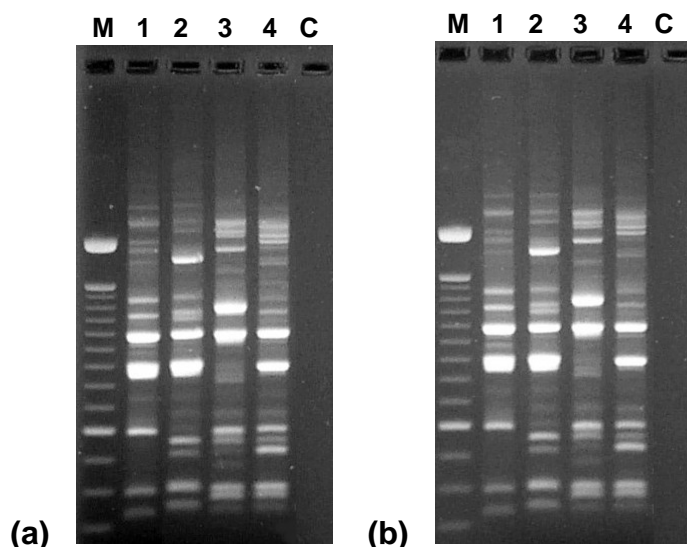


Figura 2: Teste de reprodutibilidade da reação de amplificação para 4 amostras de *P. lineatus* através do *primer* OPW6. Em (a) e (b) estão os perfis obtidos para cada amplificação realizada, sendo M o marcador de peso molecular, 1-4 as amostras de *P. lineatus* utilizadas e C o controle negativo da reação.

2.3.3 Análises estatísticas

A partir do programa computacional TFPGA 1.3 (Miller 1997) foram calculados, usando-se a correção de Lynch e Milligan (1994), os seguintes parâmetros: variabilidade genética estimada a partir da proporção de locos polimórficos (\bar{P}), usando critério de 95%; identidade e distância genética de Nei (1978) e teste exato de Fisher, aplicado para o cálculo de diferenças significativas das frequências dos marcadores nas diferentes populações.

O software ARLEQUIN versão 3.0 (Excoffier et al. 2005) foi utilizado para quantificar a diversidade genética através do índice de diversidade nucleotídica (π_n) que estima a probabilidade de que dois nucleotídeos homólogos escolhidos ao acaso sejam diferentes (Tajima 1983, Nei 1987 cf. Excoffier et al. 2005). Assim, quanto maior a variação genética, maior esta probabilidade. Para estimar a

distribuição da diversidade genética por meio das estimativas do F_{ST} entre populações (Reynolds et al. 1983, Slatkin 1995 cf. Excoffier et al. 2005), e pela análise da variância molecular (AMOVA - Excoffier, Smouse e Quattro 1992). A significância destes testes foi realizada pelo método de permutações aleatórias, com 1000 e 10000 permutações respectivamente. Para todas essas análises não é necessário assumir frequências mendelianas, o que minimiza os desvios causados pela dominância dos marcadores RAPD (Díaz et al. 2001). O uso deste programa para marcadores RAPD é indicado por Schnabel et al. em um guia de programas para análises genéticas disponível on line no endereço <http://evolution.genetics.washington.edu/PBhtmls/NATO/DAChap.pdf>.

Wright (1978) sugeriu que o F_{ST} , índice de fixação alélica, pode ser interpretado qualitativamente em termos de diferenciação genética como segue: valores de 0 a 0,05 indicam baixa, 0,05 a 0,15 moderada, de 0,15 a 0,25 alta e acima de 0,25 diferenciação genética muita alta.

O cálculo do número de migrantes por geração (Nm), que representa o fluxo gênico entre as populações, foi realizado a partir do valor do F_{ST} por meio da fórmula $Nm = (1 - F_{ST})/(4 F_{ST})$ (Black 1997). Valores de Nm superiores a 1 foram considerados como evidência de fluxo gênico (Slatkin e Barton 1989).

Para a análise da similaridade genética entre os indivíduos foi utilizado o programa computacional NTSYS-PC (Rohlf 2002), por meio do coeficiente de Jaccard (J) e pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) que permite a construção do dendrograma de similaridade genética. O software BOOD (Coelho 2000) foi utilizado para determinar a consistência de cada agrupamento através do método de reamostragem *Bootstrap* com 1000 repetições.

Para testar diferenças significativas das freqüências alélicas dos locos nos diferentes grupos de *P. lineatus* foi utilizado o teste G através do aplicativo computacional Popgen 1:31 (Yeh et al. 1999). Para melhor visualização deste teste, foi realizado um cálculo de proporção, consistindo em dividir o número de locos de RAPD com diferenças significativas nas freqüências alélicas pelo número total de locos polimórficos.

2.4 Marcadores Microssatélites

2.4.1 Reação de amplificação do DNA

No presente trabalho foram utilizados 3 locos de microssatélite identificados para a espécie *P. lineatus*: *pl 1*, *64*, *102*. O loco *pl 1* foi isolado por Hatanaka et al. em 2002. Os locos *64* e *102* e a seqüência dos *primers* flanqueadores foram gentilmente cedidos por Guillermo Ortí (comunicação pessoal) para a utilização neste trabalho.

Foram preparadas reação de amplificação de 15 µL contendo: tampão de reação com 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl pH 8,3; 0,2 mM de dNTP (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂; 0,3 µM de *primers* F e R (Invitrogen); 0,75 a 1U de Taq DNA Polimerase (EMBRAPA); 1,25 a 5 ng de DNA e água bidestilada para completar o volume. O processo de amplificação do DNA foi realizado em termociclador (PTC-100, MJ Research), os programas utilizados variaram conforme o loco estudado, sendo estabelecidas temperaturas de anelamento de 58°C para os locos *pl 1* e *64* e 51°C para o loco *102*.

2.4.2 Análise Eletroforética

Após a amplificação do DNA das amostras foi necessário fracionar os fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida desnaturante com concentrações de 8,5 % para o loco *102*; 9% para o loco *pl 1* e 9,5% para o loco *64*.

Para a obtenção dos géis, foi preparada uma solução desnaturante estoque contendo: 110 mL de solução Acrid-Bis acrilamida 29:1, 192 g de Uréia, 40 mL de TEB 10X e água ultrapura até completar o volume final de 400 mL.

Para a aplicação no gel, 5 µL de cada uma das amostras de DNA amplificado foram previamente desnaturados em termociclador por 10 minutos a 95° C na presença de 15 µL de tampão de amostra para gel desnaturante (900 µL de bromofenol 2,5%; 900 µL de xilenocianol 2,5 %; 900 µL de TEB 10X; 4,5 µL de glicerol; 1,8 µL de EDTA 0,5M pH 8,0; 3,6g de sacarose e 900 µL de formamida 75%). Após a desnaturação, 10 µL de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida.

A eletroforese foi realizada em cuba vertical e o tampão utilizado foi o TEB 1x. Como marcador foi utilizada a amostra de *P. lineatus* número 463 (proveniente da escada de transposição de Canoas II) amplificada com o *primer pl 1* que apresentou um perfil bem definido de bandas. Foram mantidos 110 volts por 6:30 horas para o loco *pl 1*; 100 volts por 8 horas para o loco *64* e 100 volts por 7 horas para o loco *102*. Os géis foram então corados com nitrato de prata, fixados e digitalizados para posterior análise.

Com a finalidade de se obter dados comparativos entre as populações de *Prochilodus lineatus* das duas escadas de transposição nas análises

dos locos de microssatélite foram utilizados 65 espécimes provenientes da escada de transposição de Canoas I e 74 de Canoas II.

2.4.3 Análises Estatísticas

Com os dados obtidos nas análises eletroforéticas, foram calculados por meio do programa computacional Popgene 1:31 (Yeh et al. 1999) os seguintes parâmetros de diversidade genética: heterozigosidade observada e esperada, freqüências alélicas, índice de fixação de Wright (1978) (estimativa de F_{IS} como medida de excesso ou falta de heterozigotos), teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (χ^2), identidade e distância genéticas de Nei (1978) e estimativa da divergência das freqüências gênicas entre as populações através das estatísticas F (Wright 1978). A escala proposta por Wright (1978), de classificação qualitativa da diferenciação genética, também foi utilizada como parâmetro para as análises genéticas obtidas com o marcador microssatélite. A significância do F_{ST} obtido através do cálculo das estatísticas F e a estimativa do número de migrantes por geração (Nm) foram estimadas pelas mesmas fórmulas propostas por Black (1997).

A diferenciação gênica, que leva em consideração a distribuição alélica entre as populações e a diferenciação genotípica que testa a distribuição dos genótipos nas diferentes populações foram estimadas para cada loco através da versão online do software GENEPOP (Raymond e Rousset 1995).

A estrutura genética das populações de *P. lineatus* provenientes das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II foi investigada através da análise de variância molecular (AMOVA - Excoffier, Smouse e Quattro 1992) implementada pelo programa ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Marcadores RAPD

Foram obtidos 216 locos, com os 14 *primers* utilizados, para os grupos de *P. lineatus* de Canoas I e 240 locos, com 15 *primers*, para Canoas II. A análise dos perfis eletroforéticos de RAPD permitiram a obtenção de dados para a estimativa de vários parâmetros de diversidade genética para os grupos de *P. lineatus* das UHEs Canoas I e II (Figuras 3 e 4).

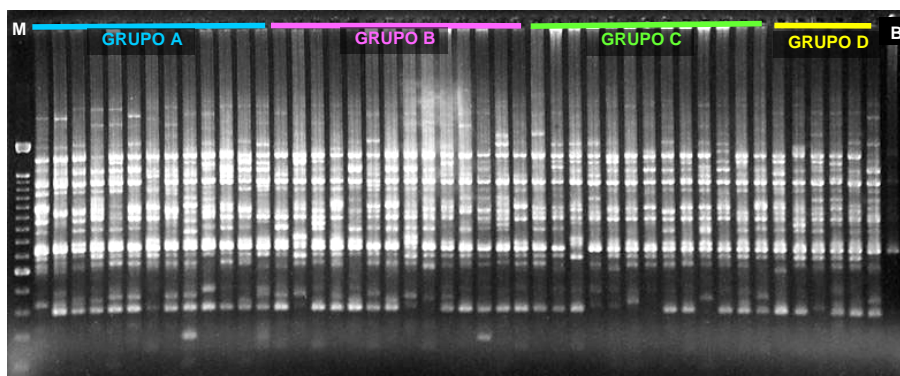


Figura 3: Perfil eletroforético de RAPD para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I, obtido com o *primer* OPW9. A coluna M representa o marcador de peso molecular de 100 bp, B o controle e as demais colunas os diferentes espécimes analisados dos grupos A, B, C e D.

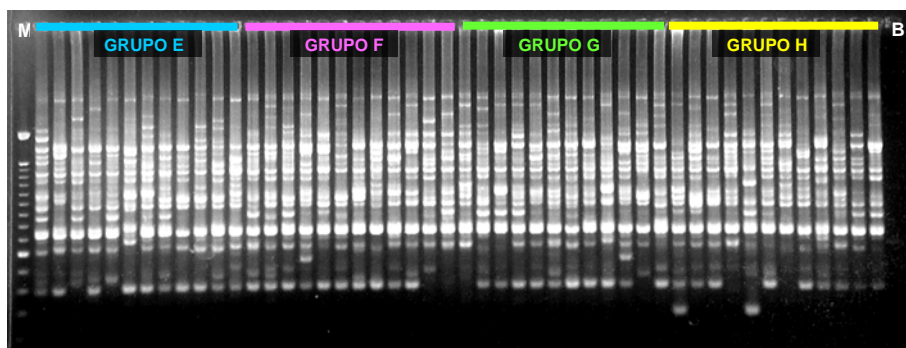


Figura 4: Perfil eletroforético de RAPD para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas II, obtido com o *primer* OPW9. A coluna M representa o marcador de peso molecular de 100 bp, B o controle e as demais colunas os diferentes espécimes analisados dos grupos E, F, G e H.

A quantificação da diversidade genética de *Prochilodus lineatus* foi estimada pelo cálculo da proporção de locos polimórficos (\bar{P}) e índice de diversidade nucleotídica (π_n) como mostra a Tabela 1. Para os grupos de *P. lineatus* da escada de transposição de peixes da UHE Canoas I os valores de \bar{P} variaram de 58,3% a 72,7% e os valores de π_n variaram de 0,286 a 0,301. Para os grupos de *P. lineatus* provenientes de Canoas II estes valores variaram de 68,6% a 71,7% e de 0,297 a 0,304.

Tabela 1: Proporção de locos polimórficos (\bar{P}) e índice de diversidade nucleotídica (π_n) para os grupos de *Prochilodus lineatus* provenientes das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

| | Grupos | Proporção de locos polimórficos (\bar{P}) | Índice de diversidade nucleotídica (π_n) |
|------------------|---------------|---|--|
| Canoas I | A | 69,9 | 0,296 (0,153) |
| | B | 71,3 | 0,300 (0,155) |
| | C | 72,7 | 0,299 (0,155) |
| | D | 58,3 | 0,286 (0,167) |
| Canoas II | E | 70,4 | 0,296 (0,155) |
| | F | 68,8 | 0,300 (0,157) |
| | G | 68,6 | 0,304 (0,159) |
| | H | 71,7 | 0,302 (0,158) |

() Desvio padrão

Os menores valores de \bar{P} e π_n foram evidenciados para o grupo D, o que pode ser reflexo do número reduzido de indivíduos utilizados nessa análise, já que, devido à escassez de espécimes coletadas no período de Jan. de 2005 foram utilizadas apenas 5 amostras para tal grupo, enquanto que para os outros grupos o número de amostras variou de 13 a 14.

Grant e Bowen (1998) em seu estudo evolutivo de peixes marinhos por meio do DNAm_t descrevem índices de diversidade nucleotídica obtidos em diversos trabalhos com espécies de peixes marinhos. Comparando os dados de π_n apresentados por estes autores com os obtidos nesse trabalho nota-se para os grupos de *P. lineatus* uma variabilidade alta se comparado ao bacalhau ($\pi_n = 0,13$) e baixa quando comparado ao peixe azul ($\pi_n = 0,70$).

Os valores de \bar{P} obtidos para os grupos de *P. lineatus* neste trabalho são altos quando comparados aos obtidos por Revaldaves et al. (1997) em estudos com *P. lineatus* provenientes do rio Paraná através de isoenzimas (\bar{P} em torno de 30%). E por Sekine et al. (2002), que utilizaram os marcadores RAPD para estudar a diferenciação genética entre populações de pintado (espécie migradora) separadas pelos Saltos de Guairá ($\bar{P} = 27\%$). Os autores propuseram que tal ocorrência deve-se provavelmente ao isolamento destas populações pelos Saltos de Guairá.

Estudos realizados utilizando também RAPD e os mesmos locais de coleta do presente estudo, obtiveram uma estimativa média de variabilidade genética (\bar{P}) de 86,74% (Canoas I) e 74,79% (Canoas II) para *Leporinus elongatus* (Ramos, 2004) e de 62,89% (Canoas I) e 62,64% (Canoas II) para *Leporinus friederici* (Ashikaga, 2005), dados estes comparáveis aos obtidos no presente estudo.

Assim, nota-se de uma maneira geral que os índices de quantificação da diversidade genética, em especial o \bar{P} , revelam uma alta variabilidade genética para a espécie *P. lineatus* provenientes das escadas de transposição de Canoas I e II.

A manutenção dos níveis de variabilidade genética está diretamente relacionada ao tamanho populacional atribuído a uma dada espécie, quanto menor a população, maior o efeito da deriva genética e assim maior a perda de variabilidade genética nessas populações. Britto e Sirol (2005) avaliando a transposição de peixes como forma de manejo no Complexo Canoas por 4 anos consecutivos (2000 - 2004), encontraram nas escadas de transposição de Canoas I e II, nos anos de 2000 e 2001, um grande número de exemplares de *Prochilodus lineatus*, que foi considerada a espécie mais abundante em tais localidades.

Por sua vez, a manutenção de um grande tamanho populacional depende diretamente da estratégia reprodutiva de uma dada espécie. Orsi (2005) em seu estudo de caracterização de estratégias reprodutivas de peixes no reservatório de Capivara, à jusante do Complexo Canoas, verificou um alto esforço reprodutivo para *P. lineatus*, sendo a espécie que apresentou os maiores índices de número e volume total de ovócitos.

Sendo assim, os índices de variabilidade genética obtidos neste estudo para *P. lineatus* podem ser explicados pelos dados obtidos por Britto e Sirol (2005) e Orsi (2005), levando em consideração a grande eficiência de seu esforço reprodutivo que permite então a manutenção de uma população grande, minimizando os efeitos da deriva genética e, portanto a perda e variabilidade genética nas populações desta espécie.

Na Tabela 2 estão dispostos os valores de distância e identidade genética, F_{ST} , número de migrantes por geração e teste exato de Fisher obtidos para a análise genética dos grupos de *P. lineatus* de Canoas I e Canoas II, respectivamente.

Tabela 2 - Distância genética (D), identidade genética (I), teste F_{ST} , número de migrantes por geração (Nm) e teste exato de Fisher entre os grupos A, B, C e D de *Prochilodus lineatus* da escada de transposição de peixes da UHE Canoas I e entre os grupos E, F, G e H de *P. lineatus* de Canoas II.

| | GRUPOS | D | I | F_{ST} | Nm | Teste Exato de Fisher | |
|------------------|--------|--------|--------|------------------------|--------|-----------------------|------|
| | | | | | | χ^2 | P |
| CANOAS I | A X B | 0,0343 | 0,9662 | 0,0330* | 7,325 | 327,33 | 0,99 |
| | A X C | 0,0335 | 0,9671 | 0,0310* | 7,814 | 330,24 | 0,99 |
| | A X D | 0,0436 | 0,9573 | 0,0300* | 8,083 | 237,61 | 1,00 |
| | B X C | 0,0320 | 0,9685 | 0,0278* | 8,742 | 254,20 | 1,00 |
| | B X D | 0,0605 | 0,9413 | 0,0518* | 4,576 | 261,50 | 1,00 |
| | C X D | 0,0363 | 0,9643 | 0,0220 ^{ns} | 11,114 | 215,83 | 1,00 |
| CANOAS II | E X F | 0,0216 | 0,9786 | 0,0251* | 9,710 | 327,23 | 0,99 |
| | E X G | 0,0284 | 0,9720 | 0,0243* | 10,038 | 254,69 | 1,00 |
| | E X H | 0,0380 | 0,9627 | 0,0423* | 5,660 | 330,64 | 0,99 |
| | F X G | 0,0117 | 0,9884 | - 0,0595 ^{ns} | Inf. | 289,94 | 1,00 |
| | F X H | 0,0205 | 0,9798 | 0,0127 ^{ns} | 19,435 | 224,30 | 1,00 |
| | G X H | 0,0269 | 0,9735 | - 0,0047 ^{ns} | Inf. | 432,00 | 1,00 |

* = Estatisticamente significativa a 5% com 1000 permutações aleatórias;

ns = Estatisticamente não significativa

GL Fisher = 432 (Canoas I) e 480 (Canoas II).

Inf. = Número infinito de migrantes por geração.

De um modo geral, para os grupos de *P. lineatus* das duas escadas de transposição estudadas, a diferenciação genética estimada através do cálculo do F_{ST} variou de moderada tendendo a baixa (0,0518 a -0,0595). Os maiores valores

deste teste foram apresentados pelas comparações dos grupos B x D (0,0518) e E x H (0,0423), sendo que os dois últimos grupos são os que apresentaram a maior distância temporal relativa às datas de coleta (15 meses), o que poderia justificar a maior diferenciação genética encontrada entre eles.

De modo complementar, as comparações entre grupos que apresentaram os menores índices de diferenciação genética foram aquelas com datas de coletas próximas: grupos C x D (0,0220) de Canoas I e grupos F x G (-0,0595) de Canoas II. No último caso, as datas de coleta têm apenas um mês de intervalo, sendo a comparação que apresentou o menor valor de F_{ST} entre todas as comparações realizadas nesta análise.

Vale salientar que os valores de F_{ST} negativos obtidos para as comparações entre os grupos F x G e G x H de *P. lineatus* de Canoas II são não significativos, ou seja, não diferem estatisticamente de zero. Assim, o valor de Nm estimado tende ao infinito, já que não existe diferenciação genética entre tais grupos e assim o fluxo gênico entre eles é irrestrito. Outros trabalhos que também apresentam valores de F_{ST} negativos podem ser destacados nas mais diversas áreas: Liebers e Helbig (2002) que estudaram a história filogeográfica de *Larus fuscus*, Pinto et al. (2004) que avaliaram a variabilidade genética de populações de *Copaifera langsdorffii* e Hedmand et al. (2004) que analisaram 16 locos de Y-STR em de populações humanas.

Resultados similares aos do presente estudo foram estimados por Sekine et al. (2002) que detectaram valores baixos de distância genética; valores de F_{ST} com índices de diferenciação de baixa a moderada e estimativa de fluxo gênico média de 4 migrantes por geração entre populações de pintado do rio Paraná. Leuzzi et al. (2004) que avaliaram, por meio do marcador RAPD, a estrutura

genética de *Astyanax altiparanae* provenientes de 4 locais do reservatório de Capivara (rio Paranapanema) também descreveram valores semelhantes aos obtidos neste trabalho, as distâncias genéticas foram baixas, o teste theta P (análogo do F_{ST}) mostrou valores de diferenciação de baixa a moderada e o número de migrantes por geração atingiu valores maiores que 1, evidenciando fluxo gênico entre as populações estudadas.

O teste exato de Fisher mostrou que não há diferenças significativas nas frequências dos marcadores entre os grupos de *P. lineatus* escadas de transposição do Complexo Canoas, indicando que baseado neste parâmetro genético os grupos também não apresentam uma diferenciação genética representativa (Tabela 2). O teste exato de Fisher se mostrou não significativo para a maioria das comparações nos estudos realizados, com o uso do marcador RAPD, em *Prochilodus marggravii* de três áreas influenciadas pela barragem de Três Marias (Hatanaka e Galetti Jr. 2003).

Os resultados obtidos pela análise molecular (AMOVA) para *P. lineatus* das duas escadas de transposição revelaram que 96,815% da variação genética encontrada para *P. lineatus* da escada de transposição de Canoas I deve-se a diferenças genéticas dentro dos grupos, sendo que apenas 3,185% refere-se à variação genética entre estes grupos, coletados em diferentes datas. Para *P. lineatus* coletados na escada de transposição de Canoas II os resultados foram mais acentuados, com 99,266% da variação devido a diferenças genéticas dentro dos grupos e apenas 0,734% entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Análise molecular de variância (AMOVA) para os grupos de *Prochilodus lineatus* coletados nas escadas de transposição de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

| Agrupamentos | Fonte de Variação | Soma dos quadrados | Componentes de variância | Porcentagem da variação |
|---------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Canoas I | Entre os Grupos | 132,813 | 1,064 | 3,185** |
| | Dentro dos Grupos | 1355,955 | 32,350 | 96,815 |
| | Total | 1488,768 | 33,414 | 100,000 |
| Canoas II | Entre os Grupos | 118,384 | 0,268 | 0,734** |
| | Dentro dos Grupos | 1588,682 | 36,258 | 99,266 |
| | Total | 1707,066 | 36,526 | 100,00 |

** Valor significativo a 1% de probabilidade com 10.000 permutação aleatórias.

Diversos trabalhos com RAPD têm utilizado a AMOVA para o cálculo de estimativas de estrutura genética populacional tendo em vista que esta análise não é influenciada pelo problema de dominância deste marcador. Díaz et al. (2001) utilizaram RAPD e AFLP em estudos de populações de *Pinus oocarpa* da Nicarágua, e verificaram através da AMOVA que apenas 3,6% da diferenciação encontrada deve-se à variação genética entre as populações, de modo que a maior parte é atribuída a diferenças genéticas dentro de cada população, um resultado similar ao obtido no presente estudo. Lougheed et al. (2000) que compararam os resultados obtidos com os marcadores RAPD e microsatélites em um estudo populacional da espécie *Sistrurus c. catenatus* (cobra cascavel) utilizaram a AMOVA para determinar a estrutura populacional desta espécie e identificaram que, diferentemente dos

dados obtidos no presente estudo, uma proporção representativa da variação genética total (14,2%) é devido à diferenciação entre as populações.

Os valores de proporção de locos polimórficos com diferença significativa nas frequências alélicas, obtidos através do teste G para as comparações entre os 4 grupos de *P. lineatus* da escada de transposição de peixes de Canoas I, estão evidenciados na Figura 5, variando de 11,2% (A x B) a 16,33% (A x C). Para os grupos de *P. lineatus* de Canoas II estes valores variaram de 8,9% (F x G) a 13,8% (E x G) (Figura 6). Esses valores são semelhantes aos obtidos para *Leporinus friderici* (Ashikaga 2005) e menores que os de *Salminus brasiliensis* (Lopes 2005) coletados nos mesmos locais do presente estudo. Mas menores quando comparados aos dados obtidos por Leuzzi et al. (2004) que atingiram valores de até 49,12% ao serem estudadas populações de *A. altiparanae* provenientes de diferentes reservatórios ao longo do rio Paranapanema.

Os dendrogramas de similaridade genética obtidos para os indivíduos dos grupos de *P. lineatus* da escada de transposição de Canoas I e Canoas II apresentaram-se formados por um único grande agrupamento, com similaridade genética variando entre 0,50 a 0,70 entre os espécimes provenientes de Canoas I (Figura 7), e de 0,53 a 0,65 entre aqueles de Canoas II (Figura 8), valores estes que estão refletindo a alta variabilidade genética (\bar{P}) estimada para estes grupos.

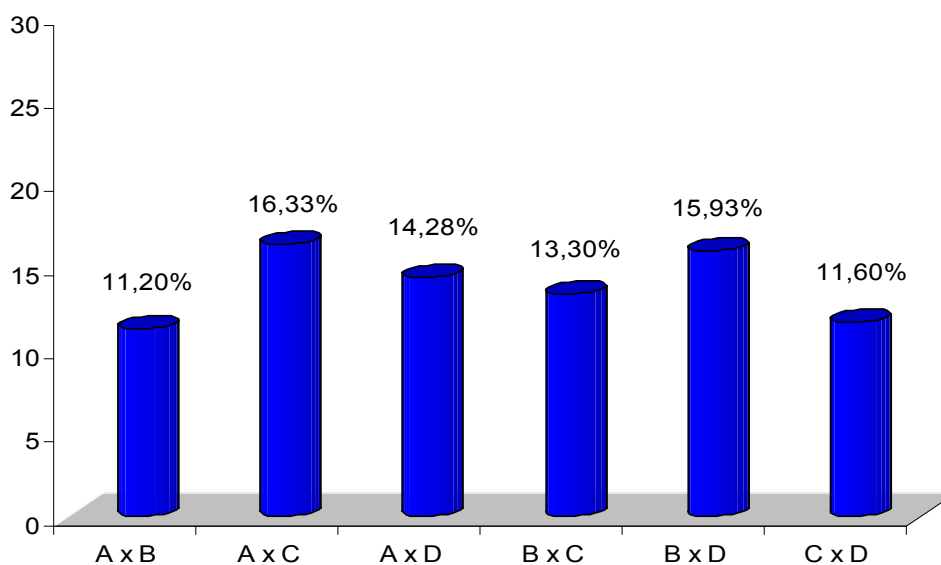


Figura 5: Proporção de locos polimórficos de RAPD com diferença significativa nas freqüências alélicas (pelo teste G), para as combinações entre os 4 grupos de *Prochilodus lineatus* da escada de transposição de peixes da UHE Canoas I – rio Paranapanema.

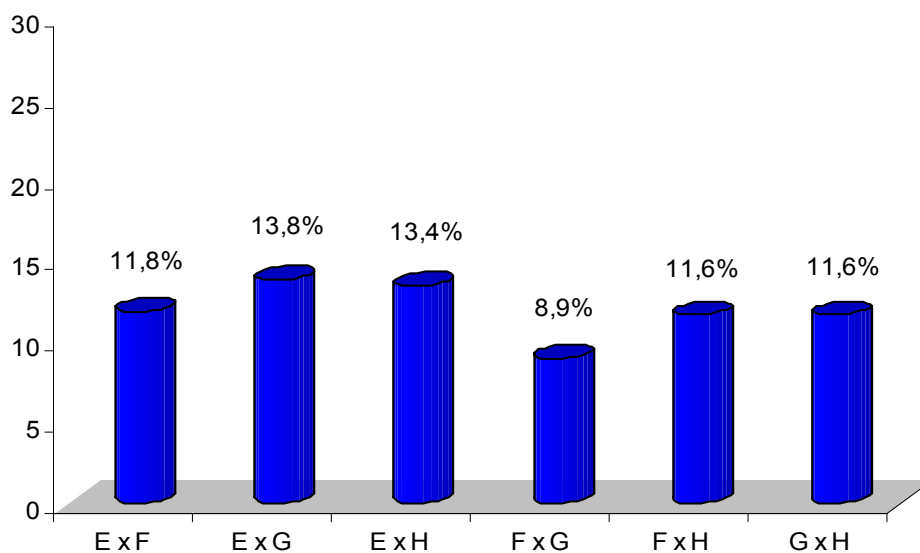


Figura 6: Proporção de locos polimórficos de RAPD com diferença significativa nas freqüências alélicas (pelo teste G), para as combinações entre 4 grupos de *Prochilodus lineatus* da escada de transposição de peixes da UHE Canoas II – rio Paranapanema.

Foram disponibilizados para cada dendrograma os valores de *bootstrap* acima de 20%, que revelam a consistência de cada agrupamento. Tais valores de *bootstrap* se mostraram na maioria dos casos reduzidos (<50%) para os dois dendrogramas, evidenciando a fragilidade dos ramos gerados. Essa fragilidade pode estar relacionada à alta variabilidade genética detectada para essa espécie, já que, dependendo dos locos utilizados pelo *bootstrap*, os espécimes podem não se agrupar sempre do mesmo modo. Assim, fica claro que tais dados devem ser interpretados com cautela e complementados por outros parâmetros genéticos.

Reforçando essa hipótese, Sofia et al. (2006) ao estudarem a estrutura genética de populações de *Astyanax scabripinis* de um ribeirão urbano, utilizando a mesma metodologia para a construção de dendrograma de similaridade genética entre os indivíduos dessa espécie, obtiveram valores de *bootstrap* baixos para a maioria dos ramos que compunham o dendrograma e valores altos de variabilidade genética ($\bar{P} \approx 64\%$) para a espécie estudada.

Os resultados obtidos pelas análises dos diferentes parâmetros genéticos são todos concordantes entre si e revelam que os grupos de *P. lineatus* da escada de transposição de Canoas I, mesmo que tenham sido coletados em piracemas diferentes, são geneticamente muito semelhantes e estão estruturados como um único agrupamento. A mesma conclusão é válida para os grupos coletados em Canoas II.

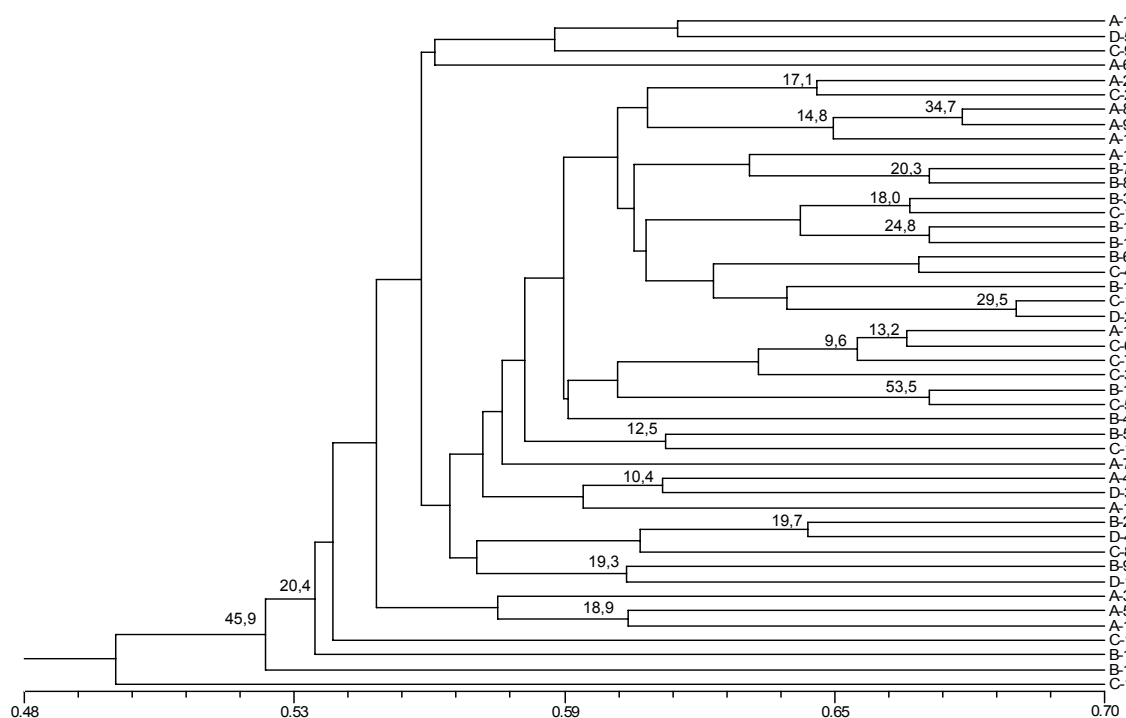


Figura 7: Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I. Grupos A, B, C e D.

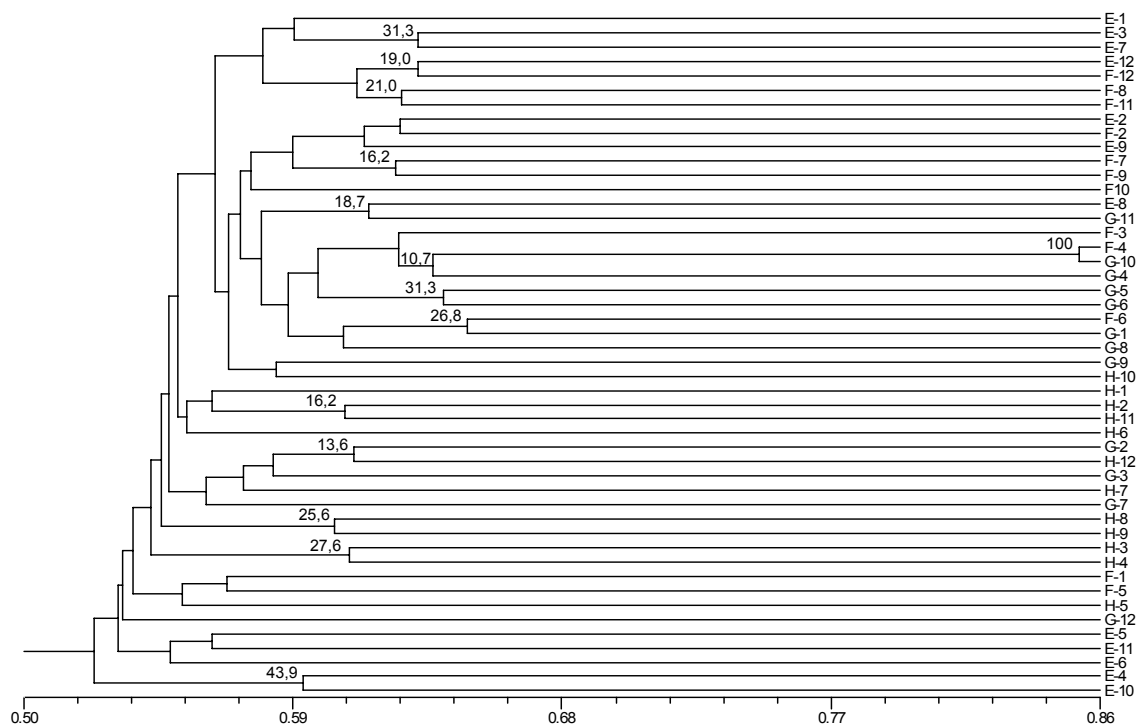


Figura 8: Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas II. Grupos E, F, G e H.

Para a análise genética comparativa entre os 8 grupos de *P. lineatus* coletados na escada de transposição da UHE Canoas I e II foram obtidos 255 locos com os 15 *primers* utilizados. A análise dos perfis eletroforéticos de RAPD (Figura 9) permitiu a obtenção de dados para a estimativa de vários parâmetros de diversidade genética entre esses grupos.

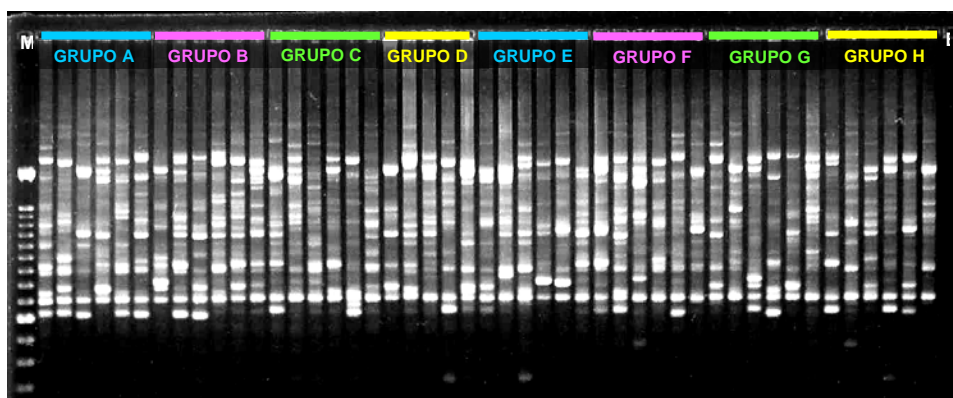


Figura 9: Perfil eletroforético de RAPD para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I e II, obtido com o *primer* OPC 15. A coluna M representa o marcador de peso molecular de 100 bp, B controle e as demais colunas os diferentes espécimes analisados dos grupos A, B, C, D, F, G e H.

As proporções de locos polimórficos (\bar{P}) e os índices de diversidade nucleotídica (π_n) obtidas nesta análise comparativa variaram de 61,9 % (grupo E) a 65,1% (grupo F) e de 0,286 (grupo G) a 0,320 (grupo F), respectivamente (Tabela 4). Pode ser detectada uma diminuição representativa nas estimativas de \bar{P} quando comparadas às obtidas para as análises anteriores (Tabela 1) provavelmente devido ao menor número de amostras utilizado para cada grupo nessa análise (6), e conseqüentemente à perda de parte dos alelos representativos desta espécie e da variabilidade genética nela contida. No entanto, os valores dos índices de diversidade nucleotídica não apresentaram decréscimo

quando comparados aos valores obtidos para as análises previamente realizadas, assim, para este parâmetro não houve influência do pequeno número amostral.

Tabela 4: Proporção de locos polimórficos (\bar{P}) e índice de diversidade nucleotídica (π_n) para os grupos de *P. lineatus* provenientes das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

| Grupos | Proporção de locos polimórficos (\bar{P}) | Índice de diversidade nucleotídica (π_n) |
|---------------|---|--|
| A | 63,137 | 0,287 (0,167) |
| B | 63,921 | 0,305 (0,178) |
| C | 62,745 | 0,289 (0,168) |
| D | 62,352 | 0,312 (0,191) |
| E | 61,960 | 0,289 (0,168) |
| F | 67,058 | 0,320 (0,186) |
| G | 62,745 | 0,286 (0,167) |
| H | 64,705 | 0,298 (0,174) |

Estão evidenciados na Tabela 5 os dados estimados para os diferentes parâmetros de diversidade genética entre as comparações dos 8 grupos de *P. lineatus* provenientes das escadas de transposição de Canoas I e II .

Os valores de F_{ST} obtidos (Tabela 5) revelaram índices de diferenciação genética de baixa, D x E (-0.0094), a moderada, C x E (0.0809), as quais apresentam um pequeno aumento ao serem comparadas com os índices de F_{ST} calculados para as análises anteriores (Tabela 2). Segundo Isabel et al. (1999), ao se estimar a diferenciação genética entre populações através do RAPD, quanto menor o número amostral maior a distorção dos índices F_{ST} . Assim, esta pequena distorção observada para os índices F_{ST} deve-se provavelmente ao reduzido tamanho amostral utilizado para esta análise.

Tabela 5: Distância genética (D), identidade genética (I), teste F_{ST} , número de migrantes por geração (Nm) e teste exato de Fisher entre os 8 grupos de *Prochilodus lineatus* da escada de transposição de peixes da UHE Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

| GRUPOS | D | I | F_{ST} | Nm | Teste Exato de Fisher | |
|--------|--------|--------|----------------------|--------|-----------------------|------|
| | | | | | χ^2 | P |
| A X E | 0,0507 | 0,9506 | 0,0578* | 4,075 | 193,3 | 1,00 |
| A X F | 0,0589 | 0,9428 | 0,0794* | 2,898 | 230,6 | 1,00 |
| A X G | 0,0562 | 0,9454 | 0,0591* | 3,980 | 209,9 | 1,00 |
| A X H | 0,0553 | 0,9462 | 0,0760* | 3,039 | 241,8 | 1,00 |
| B X E | 0,0456 | 0,9555 | 0,0402 ^{ns} | 5,968 | 161,2 | 1,00 |
| B X F | 0,0533 | 0,9481 | 0,0774* | 2,979 | 219,0 | 1,00 |
| B X G | 0,0609 | 0,9409 | 0,0618* | 3,795 | 217,2 | 1,00 |
| B X H | 0,0454 | 0,9557 | 0,0575* | 4,097 | 204,8 | 1,00 |
| C X E | 0,0607 | 0,9411 | 0,0809* | 2,840 | 193,8 | 1,00 |
| C X F | 0,0585 | 0,9431 | 0,0536* | 4,414 | 190,5 | 1,00 |
| C X G | 0,0512 | 0,9500 | 0,0525* | 4,511 | 192,7 | 1,00 |
| C X H | 0,0458 | 0,9552 | 0,0449* | 5,317 | 199,2 | 1,00 |
| D X E | 0,0307 | 0,9667 | -0,009 ^{ns} | Inf. | 215,2 | 1,00 |
| D X F | 0,0456 | 0,9555 | 0,0197 ^{ns} | 12,440 | 223,0 | 1,00 |
| D X G | 0,0512 | 0,9501 | 0,0366 ^{ns} | 6,580 | 257,7 | 1,00 |
| D X H | 0,0411 | 0,9597 | 0,0166 ^{ns} | 14,810 | 234,3 | 1,00 |

* = Estatisticamente significativa a 5% com 1000 permutações aleatórias;
 ns = Estatisticamente não significativa; GL Fisher = 510
 Inf. = Número infinito de migrantes por geração.

A análise de variância molecular (AMOVA) realizada para a análise comparativa entre os 8 grupos de *P. lineatus* de Canoas I e II revelou que 4,216% da variação genética deve-se a diferenças genéticas encontrada entre os grupos e 95,784% à variação genética dentro de cada grupo (Tabela 6). Isabel et al. (1999) sugerem que esta análise pode também ser influenciada pelo tamanho amostral. No entanto, no presente estudo o tamanho amostral utilizado nesta análise comparativa parece não ter influenciado fortemente os resultados, pois estes são compatíveis com aqueles apresentados na Tabela 3.

Tabela 6: Dados da análise molecular de variância (AMOVA) realizada com os 8 grupos de *Prochilodus lineatus* coletados nas escadas de transposição de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

| Fonte de Variação | Soma dos quadrados | Componentes de variância | Porcentagem da variação |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Entre os Grupos | 337,046 | 1,690 | 4,216** |
| Dentro dos Grupos | 1466,100 | 38,412 | 95,784 |
| Total | 1803,146 | 40,102 | 100,000 |

** Valor significativo a 1% de probabilidade com 10.000 permutação aleatórias.

Na Figura 10 estão dispostos os valores de proporção de locos polimórficos com diferença significativa nas freqüências alélicas obtidos através do teste G entre os 8 grupos de *P. lineatus*. O maior valor obtido foi de 20,54% para a comparação entre os grupos C e E, e o menor foi de 8,4% para a comparação entre os grupos D x E. De um modo geral os valores obtidos para esta análise são maiores do que aqueles apresentados nas Figuras 5 e 6, provavelmente também influenciados pelo tamanho amostral.

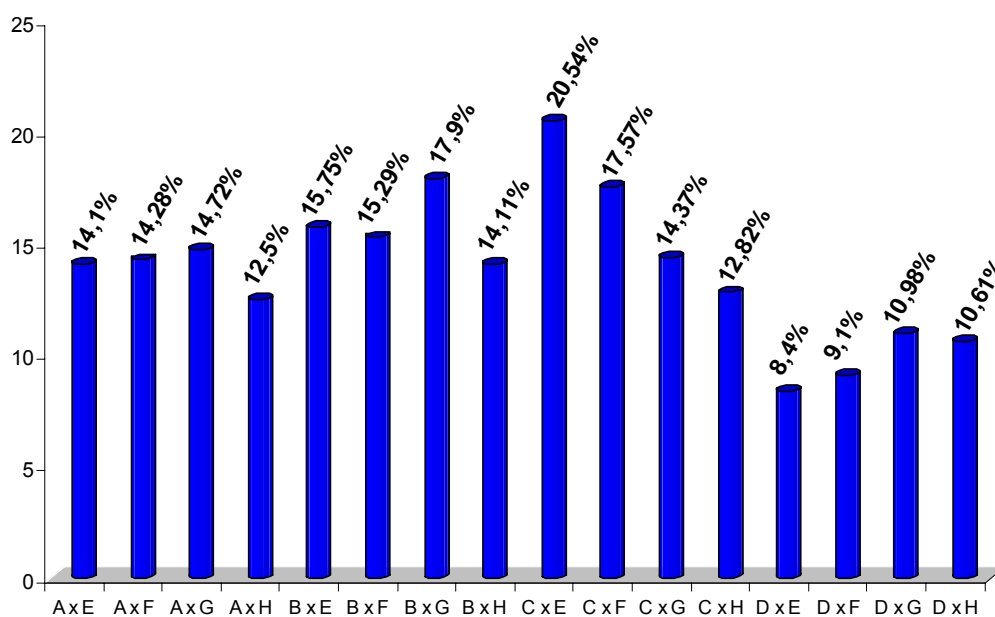


Figura 10: Proporção de locos polimórficos de RAPD com diferença significativa nas freqüências alélicas (pelo teste G), para as combinações entre 8 grupos de *Prochilodus lineatus* da escada de transposição de peixes das UHEs Canoas I e II – rio Paranapanema.

Por outro lado, o dendrograma de similaridade genética obtido através da análise genética comparativa entre os indivíduos dos grupos da UHE Canoas I e II apresentou-se formado por um único grande agrupamento (Figura 11), corroborando com os resultados obtidos para as análises anteriores (Figuras 7 e 8). Nota-se que, também para esta análise, os valores de *bootstrap* obtidos foram baixos o que implica na inconsistência dos agrupamentos formados, pelos mesmos motivos explicitados anteriormente.

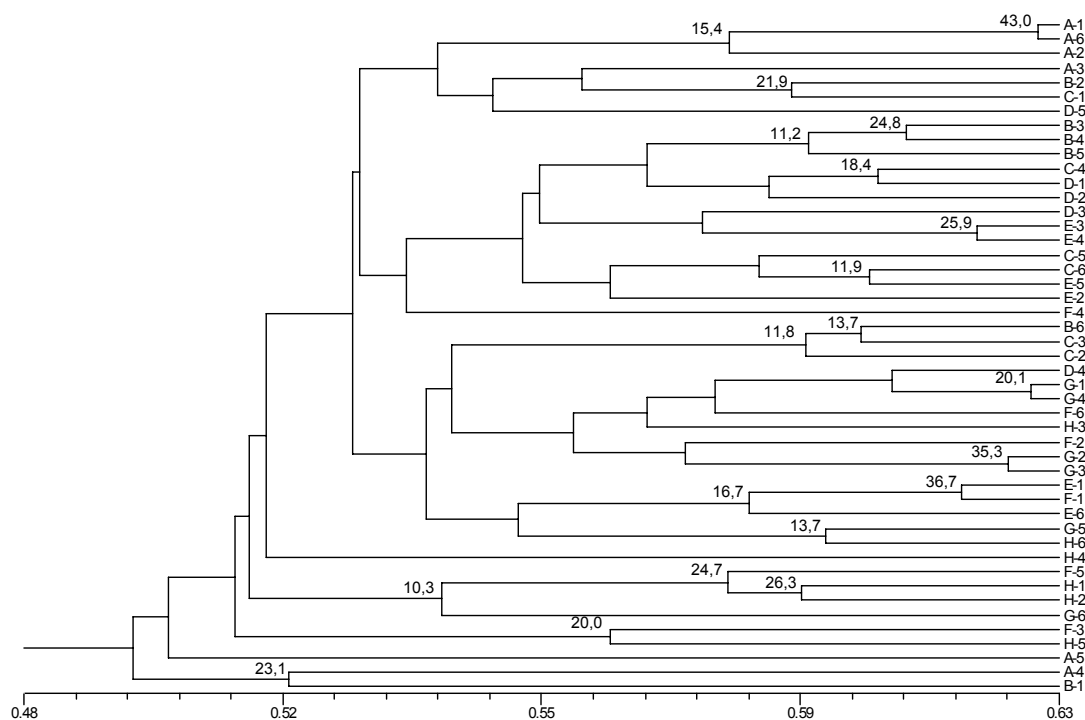


Figura 11: Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I e Canoas II. Grupos A, B, C, D, E, F, G e H.

Considerando que alguns parâmetros de diversidade genética estimados para a análise comparativa entre grupos de *P. lineatus* das duas escadas de transposição, como: distância e identidade genéticas, F_{ST} (Tabela 5) e Teste G (Figura 10) apresentaram discrepâncias com relação àqueles obtidos na análise dos grupos de cada escada de transposição (Tabela 2, Figuras 5 e 6). E que, no entanto, os dendrogramas de similaridade genética (Figuras 7, 8 e 11), as AMOVAS (Tabelas 3 e 6) e os Testes Exatos de Fisher (Tabelas 2 e 5) corroboraram para todas as análises apresentadas, indicando uma diferenciação genética baixa entre os grupos de *P. lineatus*, uma análise comparativa foi realizada considerando os grupos A, B, C e D como um único grupo de *P. lineatus* da escada de transposição de Canoas I (CI) e os grupos E, F, G e H como o grupo proveniente de Canoas II, (CII) com a

finalidade de verificar qual o comportamento dos parâmetros genéticos ao considerarmos grupos com um maior número de amostras.

Para tanto, foram utilizados os mesmos perfis eletroforéticos obtidos pela análise comparativa entre os exemplares de *P. lineatus* coletados nas UHEs de Canoas I e Canoas II (Figura 9), onde o número de locos obtidos foi de 255 e o dendrograma de similaridade genética o apresentado na Figura 11.

As estimativas de variabilidade genética obtidas para os agrupamentos de *P. lineatus* CI e CII foram respectivamente: 74,51% e 74,90%, valores similares àqueles obtidos para as análises dos diferentes grupos de *P. lineatus* de Canoas I e Canoas II que, em média, apresentaram 70% de locos polimórficos (Tabela 1). Do mesmo modo, os índices de diversidade molecular foram concordantes com os dados previamente obtidos (Tabela 1), atingindo valores iguais a 0,302 e 0,295 para os agrupamentos de *P. lineatus* de Canoas I e Canoas II respectivamente.

Na Tabela 7 encontram-se os resultados dos demais parâmetros de diversidade genética estimados para a comparação dois agrupamentos de *P. lineatus* (CI e CII). Os valores obtidos foram coerentes com as análises realizadas individualmente para os grupos de cada escada de transposição. Há uma baixa diferenciação genética entre os agrupamentos de Canoas I e Canoas II ($F_{ST} = 0.0324$) que é comprovada pelos demais parâmetros estimados: $Nm = 7,466$ (evidência de fluxo gênico), elevada identidade genética (0,9836), teste exato de Fisher não significativo a 5% e teste G evidenciando que somente 11,3% dos locos polimórficos exibem diferenças significativas em suas freqüências alélicas entre os dois agrupamentos.

Tabela 7: Proporção de locos polimórficos com diferenças significativas nas frequências alélicas, obtidos pelo teste G (G), distância genética (D), identidade genética (I), teste F_{ST} , número de migrantes por geração (Nm) e teste exato de Fisher entre *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de peixes de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

| Agrupamentos | Teste G | D | I | F_{ST} | Nm | Teste Exato de Fisher | |
|-----------------|---------|--------|--------|----------|------|-----------------------|------|
| | | | | | | χ^2 | P |
| CI X CII | 11,3% | 0,0166 | 0,9836 | 0,0324* | 5,16 | 452,08 | 0,96 |

* = Estatisticamente significativa a 5%; () Desvio padrão;
GL Fisher = 510.

De modo similar às análises anteriores, a análise molecular de variância demonstrou que a maior parte da variação genética existente nestes agrupamentos (96,768%) é devido a diferenças genéticas dentro dos agrupamentos, e não à diferenciação genética entre eles (3,242%) (Tabela 8).

Tabela 8: Dados da análise molecular de variância (AMOVA) realizada com os agrupamentos de *Prochilodus lineatus* de Canoas I e Canoas II - rio Paranapanema.

| Fonte de Variação | Soma dos quadrados | Componentes de variância | Porcentagem da variação |
|-------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre os Grupos | 59,500 | 1,117 | 3,242** |
| Dentro dos Grupos | 1498,734 | 33,305 | 96,768 |
| Total | 1558,234 | 34,022 | 100,00 |

** Valor significativo a 1% de probabilidade com 10.000 permutação aleatórias.

Revaldaves et al. (1997) estudaram três subpopulações de *P. lineatus* da bacia do rio Paraná, e para tanto, coletaram espécimes de três regiões desta bacia intensamente impactadas por sistema de reservatórios em cascata, com o objetivo de contribuir para o delineamento de estratégias de manejo e conservação

que garantissem a manutenção dos índices de variabilidade desta espécie. Foram detectados níveis baixos de estruturação genética entre estes locais ($F_{ST} = 0,018$), assim como um alto índice de similaridade revelado pelos valores de distância e identidade genética. A baixa estruturação genética evidenciada foi atribuída à ampla dispersão desta espécie ao longo desta bacia, assim como por seu comportamento panmítico. De uma maneira geral, os autores concluíram que, embora o estudo fosse preliminar, sugeriu fortemente que as subpopulações compreendem um único estoque.

Tendo em vista os dados obtidos por meio do marcador RAPD pode-se concluir que a espécie *P. lineatus* no Complexo Canoas apresenta um índice de variabilidade genética muito bom (acima de 70%), mantido pelas características biológicas dessa espécie. Os agrupamentos de *P. lineatus* de Canoas I e Canoas II apresentam diferenciação genética baixa entre si, o que foi confirmado por todas as análises de diversidade genética conduzidas para estes agrupamentos. Assim, os dados obtidos através da técnica de RAPD no presente estudo sugerem que a espécie *P. lineatus* das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II está estruturada geneticamente como uma única população.

3.2 Marcadores Microssatélites

Como mencionado anteriormente para análise dos locos de microssatélites foram utilizados 139 espécimes de *P. lineatus* (65 provenientes da escada de transposição de Canoas I e 74 de Canoas II) separados em dois grandes agrupamentos (CI e CII).

Para o loco *pl 1* foram obtidos 23 alelos, os quais foram nomeados de *pl 1-A* a *pl 1-W*, partindo - se da origem em direção ao *front* de migração. A mesma nomenclatura foi utilizada para os demais locos. Os *primers* utilizados geraram para os locos *64* e *102* respectivamente 21 (*64-A* a *64-U*) e 22 alelos (*102-A* a *102-V*). O grande número de alelos obtidos para cada loco reflete a alta variabilidade genética desta espécie, já reportada neste estudo por meio do marcador RAPD. Herwerden et al. (2003) utilizaram o marcador microssatélite para estudar a variabilidade e estrutura genética da truta marrom e verificaram de modo similar ao presente estudo, um número elevado de alelos, identificando até 42 para um determinado loco.

A análise dos perfis eletroforéticos de microssatélite (Figuras 12, 13 e 14) permitiu a obtenção de dados para a estimativa de vários parâmetros de diversidade genética entre os dois grupos de *P. lineatus* da UHE Canoas I e II.

Os valores de heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índice de fixação de Wright (1978), número de amostras analisadas e os do teste χ^2 para o equilíbrio genético de Hardy-Weinberg (E.H.W) são apresentados na Tabela 9.

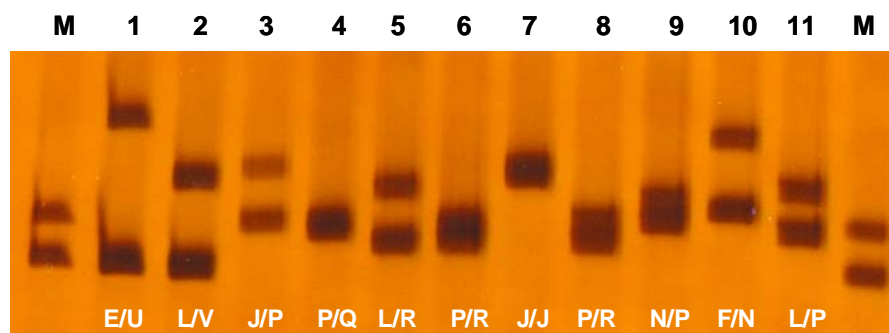


Figura 12: Perfil eletroforético para o loco *pl 1* de microssatélite obtido para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I (1-11). Em branco estão dispostos os fenótipos atribuídos para cada amostra de *P. lineatus*. A coluna M representa o marcador.

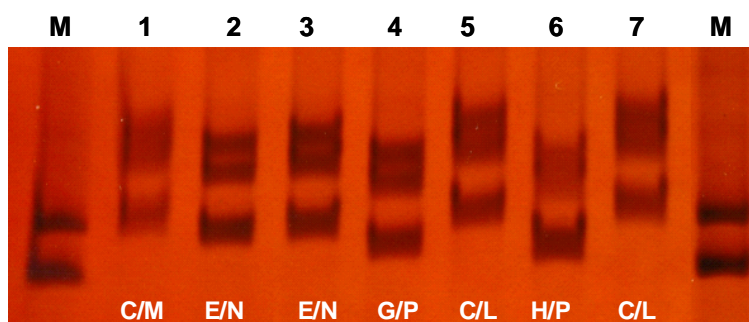


Figura 13: Perfil eletroforético para o loco *64* de microssatélite obtido para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas I (1-7). Em branco estão dispostos os fenótipos atribuídos para cada amostra de *P. lineatus*. A coluna M representa o marcador.

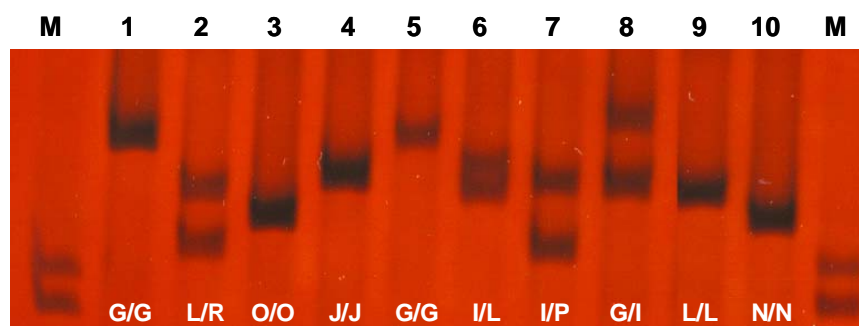


Figura 14: Perfil eletroforético para o loco *102* de microssatélite para *Prochilodus lineatus*, capturados na escada de transposição de peixes da UHE Canoas II (1-10). Em branco estão dispostos os fenótipos atribuídos para cada amostra de *P. lineatus*. A coluna M representa o marcador.

Tabela 9: Heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índices de fixação (F_{IS}), teste de equilíbrio genético (E.H.W) para *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

| | LOCOS | N | H_o | H_e | F_{IS} | Teste E.H.W | | |
|-----------|--------------|-----|--------|--------|----------|-------------|-----|---------|
| | | | | | | χ^2 | G.L | p |
| | <i>pl 1</i> | 130 | 0,8154 | 0,8824 | 0,0688 | 369,98 | 171 | 0,000** |
| CANOAS I | 64 | 120 | 1,0000 | 0,9111 | - 0,106 | 321,21 | 153 | 0,000** |
| | 102 | 84 | 0,2381 | 0,9185 | 0,7377 | 694,91 | 136 | 0,000** |
| | Média | | 0,6845 | 0,9044 | --- | | | |
| | <i>pl 1</i> | 148 | 0,7162 | 0,9106 | 0,2082 | 289,77 | 231 | 0,005** |
| CANOAS II | 64 | 126 | 1,0000 | 0,9252 | - 0,089 | 357,31 | 171 | 0,000** |
| | 102 | 98 | 0,2857 | 0,9424 | 0,6937 | 689,89 | 171 | 0,000** |
| | Média | | 0,6673 | 0,9271 | --- | | | |

** = Valor estatisticamente significante a 1%.

G.L = graus de liberdade

Os valores médios de heterozigosidade observada (\bar{H}_o) e esperada (\bar{H}_e) para *P. lineatus* dos agrupamentos de CI e CII (Tabela 9) são considerados altos se comparados aos obtidos para a mesma espécie por Revaldaves et al. (1997), por meio da técnica de isoenzimas ($\bar{H}_o = 0,130$) e por Zenatti (2003), utilizando dois locos de microssatélite ($\bar{H}_o = 0,64$). Os dados obtidos também refletem a alta variabilidade genética de *P. lineatus* analisados no presente estudo, o que já foi evidenciado por meio da estimativa da proporção de locos polimórficos obtida através do marcador RAPD. Excepcionalmente para o loco 102 foi detectado um baixo valor de H_o para *P. lineatus* dos agrupamentos de CI e CII, o que pode estar relacionado ao menor número amostral utilizado para este loco (84 – CI e 98 – CII) quando comparado aos demais locos estudados.

Para os dois agrupamentos CI e CII foi observado para os locos *pl 1* e *102* valores menores de H_o se comparados aqueles estimados para H_e (Tabela 12), vale destacar que esta diminuição foi mais acentuada para o loco *102*. A observação de um número menor de heterozigotos do que o esperado para os dois locos reflete no desequilíbrio genético obtido e no índice de endogamia (F_{IS}), que atingiu valores de até 0.7377 para o loco *102*.

Bártfai et al. (2003) estudando dois estoques cultivados de carpa húngara por meio de 4 locos do marcador microssatélite detectaram de uma maneira geral, um decréscimo de aproximadamente 17% entre os valores de H_o e H_e obtidos para os dois estoques de carpas. Assim como no presente estudo, tal decréscimo se mostra refletido na presença de um coeficiente de endocruzamento de 0,17 e no desequilíbrio genético revelado para as duas populações.

Em contraste, para o loco *64* foi observado, para os dois agrupamentos de *P. lineatus*, um aumento de heterozigotos observados em relação ao esperado e conseqüentemente um menor valor dos índices de endogamia para os dois agrupamentos ($F_{IS} = - 0,106$ para CI e $F_{IS} = - 0,089$ para CII). Tal loco também se mostrou em desequilíbrio genético.

Nas Figuras 15, 16 e 17 são apresentadas, respectivamente, as freqüências alélicas geradas para os locos *pl 1*, *64* e *102* na análise dos indivíduos de *P. lineatus* das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II.

Para o loco *pl 1*, nota-se a presença de um alelo exclusivo para o agrupamento CI (*pl 1-A*) e quatro alelos específicos para o agrupamento CII (*pl 1-C*, *pl 1-U*, *pl 1-V*, *pl 1-W*), sendo que o alelo *pl 1-P* é o mais freqüente para os dois agrupamentos de *P. lineatus* e o alelo *pl 1-O* apresentou a mesma freqüência para ambos os agrupamentos (Figura 15).

Analisando as freqüências alélicas obtidas para o loco 64 pode-se detectar um alelo exclusivo para o agrupamento CI (64-T) e dois alelos exclusivos para o agrupamento CII (64-I e 64-S). O alelo 64-M foi o mais freqüente para os dois agrupamentos e os alelos 64-D, 64-F, 64-K e 64-Q apresentaram freqüências semelhantes tanto para CI quanto para CII (Figura 16).

Para o loco 102, foram observados cinco alelos específicos para cada agrupamento: 102-A, 102-D, 102-Q, 102-T e 102-U (CI) e 102-C, 102-E, 102-F, 102-P e 102-V (CII), sendo o alelo 102-G o mais freqüente para o agrupamento CI, e o alelo 102-K para CII. É importante salientar que diferentemente dos locos *pl 1* e 64, o loco 102 apresentou a maioria dos alelos com freqüências discrepantes para os dois agrupamentos (Figura 17).

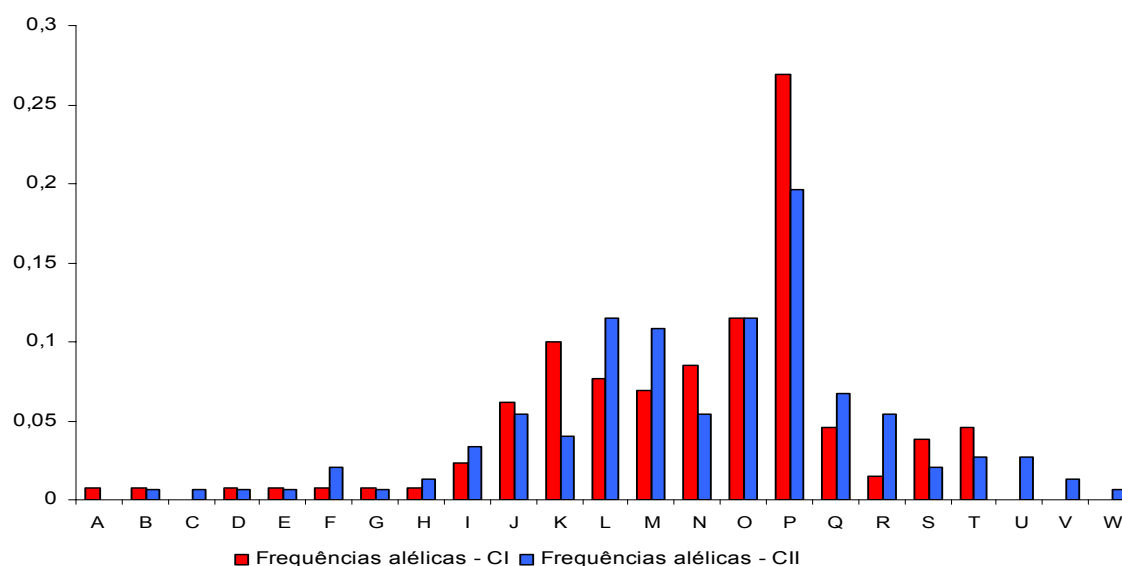


Figura 15: Dados de freqüências alélicas para o loco *pl 1* de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II- rio Paranapanema.

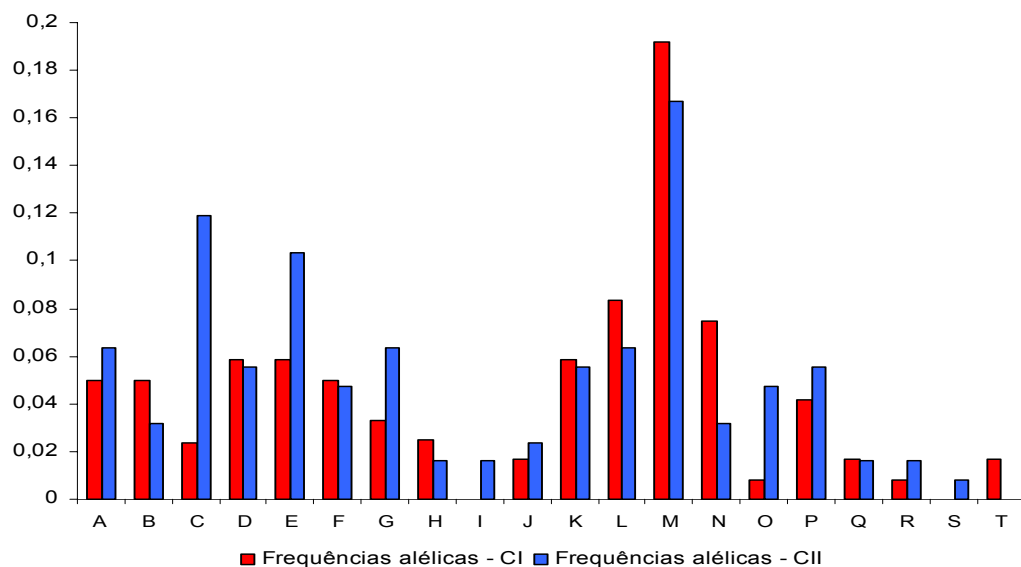


Figura 16: Dados de frequências alélicas para o loco 64 de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

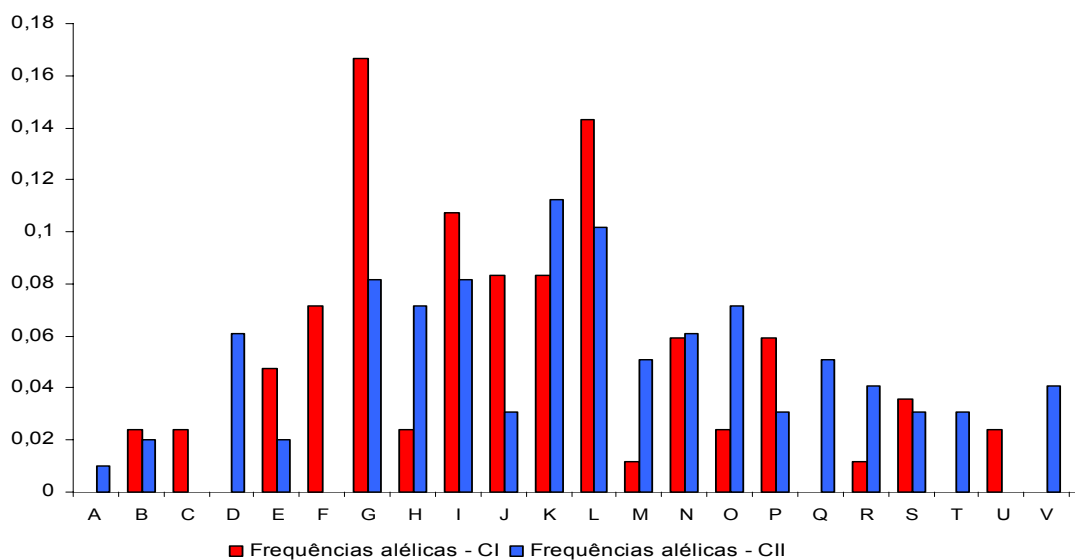


Figura 17: Dados de frequências alélicas para o loco 102 de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II.

O teste de diferenciação gênica (Raymond e Rousset 1995) entre os agrupamentos de CI e CII revelou resultados não-significativos ($p > 0,01$) para os locos *pl* 1 e 64, indicando que não existem diferenças na distribuição de alelos

destes locos entre estes agrupamentos. Para o loco 102 foi evidenciada uma diferenciação significativa ($p < 0,01$), ou seja, há uma distribuição diferencial dos alelos desse loco entre os dois agrupamentos (Tabela 10). Esses dados são concordantes com as estimativas de freqüências alélicas obtidas para os três locos (Figuras 15, 16 e 17), uma vez que o loco 102, que apresentou a maioria dos alelos com freqüências discrepantes para os dois agrupamentos também, foi o único que evidenciou um resultado significativo para o teste de diferenciação gênica (Tabela 10).

Por sua vez, o teste de diferenciação genotípica (Raymond e Rousset 1995) revelou valores não significativos ($p > 0,01$) para os três locos analisados, indicando que os genótipos se distribuem identicamente nos dois agrupamentos (Tabela 10).

Tabela 10: Significância dos testes de diferenciação gênica e genotípica entre os agrupamentos de Canoas I e Canoas II para os locos *pl 1*, *64* e *102*.

| Agrupamentos | Teste de diferenciação gênica | | | Teste de diferenciação genotípica | | |
|------------------|-------------------------------|-----------|---------|-----------------------------------|--------|--------|
| | Loco | p | E.P | Loco | p | E.P |
| Canoas I | <i>pl 1</i> | 0.35544 | 0.00495 | <i>pl 1</i> | 0,5305 | 0.0043 |
| x | <i>64</i> | 0.83992 | 0.00769 | <i>64</i> | 0,6981 | 0.0036 |
| Canoas II | <i>102</i> | 0.00056** | 0.00027 | <i>102</i> | 0,1568 | 0.0082 |

** = Estatisticamente significativa a 1%
E.P = erro padrão

Os dados comparativos obtidos por meio da análise de variância molecular (AMOVA) entre os agrupamentos de *P. lineatus* de Canoas I e II estão dispostos na Tabela 11, onde pode-se observar que o maior componente da

variação (99,839%) deve-se a diferenças genéticas dentro dos agrupamentos e não entre estes (0,171%).

Tabela 11: Dados da análise molecular de variância (AMOVA) realizada entre os agrupamentos de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II - rio Paranapanema.

| Agrupamentos | Fonte de Variação | Soma dos quadrados | Componentes de variância | Porcentagem da variação |
|---------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Canoas I | Entre os Agrupamentos | 1,661 | 0,002 | 0,171** |
| x | | | | |
| Canoas II | Dentro dos Agrupamentos | 369,105 | 1,337 | 99,839 |
| | Total | 370,766 | 1,339 | 100,00 |

** Valor significativo a 1% de probabilidade com 10.000 permutação aleatórias.

O fato de que o maior componente da variação genética está contido dentro dos agrupamentos de *P. lineatus* de Canoas I e Canoas II, indica que o tamanho amostral utilizado nas análises do marcador microssatélite provavelmente capturou uma grande proporção de variabilidade genética contida na população dessa espécie no Complexo Canoas, o que é de grande importância para estudos de manejo e conservação.

A AMOVA obtida para os marcadores microssatélites (Tabela 11) corrobora com àquela revelada por meio dos marcadores RAPD (Tabela 8), indicando que de fato, a maior parte da variação genética destes agrupamentos está dentro e não entre eles. Um importante aspecto a ser considerado é que o número amostral utilizado para as análises com microssatélite foi mais representativo do que àquele utilizado para o RAPD. Tal fato pode justificar a maior diferenciação genética entre os agrupamentos revelada através do marcador RAPD (3,24%, Tabela 8)

quando comparada à diferenciação genética entre os agrupamentos revelada pelo marcador microssatélite (0,17% , Tabela 11).

Na Tabela 12 são demonstrados os valores médios comparativos de distância, identidade genética, estatística F (F_{IT} , F_{ST} e F_{IS}) e estimativa de fluxo gênico (Nm), obtidos pela análise comparativa entre os agrupamentos de *P. lineatus* das escadas de transposição de peixes de Canoas I e Canoas II, com a utilização dos três locos de microssatélite.

Tabela 12: Valores da estatística F (F_{IT} , F_{ST} e F_{IS}), distância (D) e identidade (I) genética, número de migrantes por geração (Nm) obtidos para *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

| LOCALIDADES | D | I | F_{IT} | F_{IS} | F_{ST} | Nm |
|-------------|--------|--------|----------|----------|----------------------|--------|
| C I X C II | 0,0702 | 0,9323 | 0,2592 | 0,2549 | 0,0059 ^{ns} | 42,123 |

ns = valor não significante a 5%.

A significância do índice de fixação entre as populações (F_{ST}) foi estimada através do teste χ^2 . O qual evidenciou um valor não significativo de χ^2 igual a 1,6402, refletindo a ausência de diferenciação genética entre os agrupamentos de *P. lineatus* coletados nas escadas de transposição de Canoas I e Canoas II. Reforçando essa hipótese o valor de Nm calculado foi elevado, podendo ser considerado uma evidência de fluxo gênico entre tais agrupamentos de 42,123 indivíduos por geração.

Considerando que os agrupamentos de *P. lineatus* são compostos por grupos de indivíduos com diferentes datas de coleta foi realizada uma análise de variância molecular para cada agrupamento separadamente. Os grupos foram

divididos conforme mostra a Tabela 13 com o intuito de verificar se a variação genética estimada pela análise de AMOVA anterior (Tabela 11) é resultante de diferenças genéticas entre ou dentro dos grupos de *P. lineatus* com diferentes datas de coleta.

Tabela 13: Grupos de *Prochilodus lineatus* coletados nas escadas de transposição de Canoas I e Canoas II, suas respectivas datas de coleta e número de amostras analisadas.

| Agrupamentos | Canoas I | | | Canoas II | | |
|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| | Início 2003 | Final 2003 | Final 2004 | Final 2003 | Final 2004 | Início 2005 |
| Grupos | A | B | C | D | E | F |
| Nº de amostras | 17 | 23 | 25 | 25 | 25 | 24 |

Os dados obtidos por esta análise são mostrados na Tabela 14 e revelam que para o agrupamento de Canoas I 1,792% da variação genética existente pode ser atribuída a diferenças genéticas entre os grupos de *P. lineatus* e que 98,218% se deve a diferenças genéticas dentro de cada grupo. Para o agrupamento de Canoas II os resultados foram muito semelhantes, com estes mesmos parâmetros atingindo valores de 2,934 e 97,076%, respectivamente.

Tabela 14: Dados da análise molecular de variância (AMOVA) dos grupos de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II - rio Paranapanema.

| Agrupamentos | Fonte de Variação | Soma dos quadrados | Componentes de variância | Porcentagem da variação |
|------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Canoas I | Entre os Grupos | 4,662 | 0,024 | 1,792** |
| | Dentro dos Grupos | 166,146 | 1,308 | 98,218 |
| | Total | 170,808 | 1,332 | 100,00 |
| Canoas II | Entre os Grupos | 6,576 | 0,039 | 2,934** |
| | Dentro dos Grupos | 191,721 | 1,323 | 97,076 |
| | Total | 198,297 | 1,302 | 100,00 |

** Valor significativo a 1% de probabilidade com 10.000 permutação aleatórias.

Foram também calculados: estatísticas F (F_{IT} , F_{ST} e F_{IS}) e estimativa de fluxo gênico (Nm), entre os grupos de *P. lineatus* de cada escada de transposição, visando estabelecer os índices de diferenciação genética entre os mesmos (Tabela 15). Todos os valores de F_{ST} estimados foram não significativos ao nível de 5% indicando a ausência da diferenciação genética entre os grupos de Canoas I e Canoas II. Os índices de fixação intrapopulacional (F_{IS}) obtidos atingiram valores elevados quando comparados aos valores de F_{ST} , variando de 0,1758 a 0,2669, sugerindo que a maior parte da variação genética observada nos agrupamentos de Canoas I e Canoas II deve-se à endogamia dentro de cada grupo, e não à deriva genética. Tais dados corroboram diretamente com a análise de variância molecular realizada previamente (Tabela 14).

Tabela 15: Valores da estatística F (F_{IT} , F_{ST} e F_{IS}), número de migrantes por geração (Nm) obtidos para os grupos de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

| Agrupamentos | Grupos | F_{IT} | F_{IS} | F_{ST} | Nm |
|--------------|--------|----------|----------|----------------------|-------|
| Canoas I | A x B | 0,2940 | 0,2669 | 0,0370 ^{ns} | 6,51 |
| | A X C | 0,2421 | 0,2223 | 0,0255 ^{ns} | 9,75 |
| | B X C | 0,1905 | 0,1758 | 0,0179 ^{ns} | 13,72 |
| Canoas II | D X E | 0,2658 | 0,2497 | 0,0215 ^{ns} | 11,38 |
| | D X F | 0,2698 | 0,2525 | 0,0231 ^{ns} | 10,57 |
| | E X F | 0,2419 | 0,2238 | 0,0233 ^{ns} | 10,47 |

ns = valor não significante a 5%.

Lougheed et al. (2005) compararam os resultados obtidos com marcadores RAPD e microssatélite no estudo populacional de uma espécie de cobra (*Sistrurus c. catenatus*) e observaram uma concordância entre as estimativas de diversidade genética obtidas entre os dois tipos de marcadores.

Do mesmo modo, os dados obtidos neste estudo com os marcadores RAPD e microssatélite se mostraram concordantes, já que foi evidenciado pelas duas análises um alto índice de variabilidade genética, assim como uma baixa diferenciação genética entre os agrupamentos de *P. lineatus* das escadas de transposição das UHEs Canoas I e Canoas II. A análise conjunta dos dados evidencia que *Prochilodus lineatus* do Complexo Canoas compõem uma única população.

A preocupação com os efeitos das barragens na movimentação de peixes ao longo dos rios foi a primeira importante motivação manifestada pelo Estado para a proteção dos recursos pesqueiros. O sucesso das escadas de peixes

na transposição de cardumes de salmão na América do Norte estimulou os legisladores brasileiros a produzirem o primeiro documento legal importante relacionado ao assunto no Brasil (Lei nº 2250, do Estado de São Paulo de 28/12/1927) que tornava obrigatória a instalação de escadas de transposição de peixes em todas as barragens daquele estado (Agostinho e Gomes 2005).

Segundo esses autores, os poucos estudos existentes sobre a eficiência destas escadas referem-se à habilidade dos peixes transporem as escadas, sem maiores preocupações com o que ocorre depois, inclusive a possibilidade de impactos negativos sobre a ictiofauna regional.

Não há dúvida de que os grandes peixes migradores podem transpor escadas e continuar a migração ascendente depois da transposição (Agostinho et al. 1992; Agostinho e Gomes 2005). No entanto, os aspectos mais críticos referem-se à existência e a adequacidade das áreas remanescentes a montante para a desova, especialmente em bacias ocupadas por cadeias de reservatórios, como é o caso do rio Paranapanema.

Caso os tributários a montante tenham condições apropriadas à desova e ela efetivamente ocorra, seria importante o levantamento de dados sobre a taxa de mortalidade dos ovos e larvas devido a sua deriva sobre as águas transparentes e lênticas dos reservatórios, já que as espécies migradoras desovam durante o período de chuva, quando as águas turbidas contribuem para reduzir a mortalidade por predadores visuais (Agostinho et al. 2003). Além disso, os ovos das espécies migradoras poderiam decantar já que estes requerem alguma movimentação da coluna d'água para que permaneçam em suspensão e assim ocorra à renovação do oxigênio no seu micro-habitat. A transposição para jusante, caso as larvas consigam alcançar a barragem, pode ser uma fonte adicional de

mortalidade. Desta forma é difícil conceber a possibilidade de que a parte do estoque migradores transpostos a montante para a desova possa contribuir com o recrutamento de novos indivíduos aos trechos a jusante. O retorno dos indivíduos que transpuseram a escada é, também, uma restrição à efetividade da transposição como recurso à conservação da ictiofauna. Espera-se que a seleção na transposição a jusante seja ainda maior que aquela a montante, visto que espécies migradoras, em geral preferem ambientes lóticos durante a maior parte do ciclo de vida, o que contrasta com as condições mais internas dos reservatórios (Agostinho e Gomes 2005).

Britto e Sirol (2005) realizaram coletas para marcação e recaptura nas escadas de transposição do Complexo Canoas no período de novembro de 2000 a abril de 2001 e conseguiram capturar 1.762 espécimes de *P. lineatus* neste período. No período compreendido de março de 2003 a março de 2005, com o esforço de coleta foram obtidos somente 216 exemplares dessa espécie para o presente estudo, uma sensível redução no número de espécimes. Vale ressaltar que tanto a UHE Canoas I quanto a Canoas II iniciaram suas atividades no ano de 1998 e suas escadas de transposição foram abertas a partir de 2000, ano em que as coletas para os estudos de Brito e Sirol foram realizadas, portanto, o impacto tanto das barragens sobre a ictiofauna quanto a utilização das escadas de transposição de peixes na época dos estudos desses autores eram recentes. O presente estudo, porém teve suas coletas iniciadas após cinco anos de funcionamento das duas usinas hidroelétricas e três anos após a abertura pela primeira vez das escadas de transposição, ou seja, o tempo de exposição dos recursos hídricos às ações impactantes foi maior nesse estudo do que no dos referidos autores.

A análise dos retornos e o monitoramento realizado nos anos subseqüentes a 2000, demonstraram que as escadas não são efetivas como mecanismo para descida dos peixes, não favorecendo os fenômenos de “rodada” rio abaixo, na mesma intensidade que a migração ascendente. Esse fenômeno pode ser decorrente da amortização do fluxo hidráulico descendente, normalmente observado em rios livres (Britto e Sirol 2005).

De modo semelhante, Agostinho et al. (2002) ao caracterizarem a biodiversidade de peixes da Bacia do Rio Paraná relataram que após a construção do reservatório de Itaipú ocorreram mudanças na abundância de algumas das principais espécies da bacia, sendo que a espécie *P. lineatus* apresentou um declínio devido à falta de enchentes nas áreas de desova e berçário.

Segundo Britto e Sirol (2005) em seus estudos visando avaliar a ocorrência de reprodução das espécies identificadas nesses mecanismos de transposição, verificaram que para o período de 2000 a 2002 foi obtida baixa captura para os itens de ictioplâncton (ovos, larvas e pós-larvas) a montante das escadas e que a identificação do material revelou que nenhuma das espécies encontradas pertencia àquelas migradoras identificadas nas escadas. Bem como que para a coleta de juvenis (período de 2002 a 2004) em nenhum dos reservatórios (Canoas I e Canoas II) foi constatada a ocorrências de formas juvenis das espécies tipicamente migradoras identificadas durante o monitoramento da transposição. Desta forma concluíram ainda, que o sucesso reprodutivo das espécies migradoras identificadas, entre elas *P. lineatus*, não está sendo consolidado. A falha na reprodução das diferentes espécies migradoras identificada estaria ligada à ausência de ambientes favoráveis nos reservatórios de Canoas I e Canoas II, além da severa restrição imposta pela ausência de trechos lóticos entre reservatórios, o

que pode ter influenciado na dispersão e manutenção de ovos na coluna d'água, afetando a taxa de eclosão e a sobrevivência de larvas.

Orsi (2005) destaca que o reservatório Capivara (jusante da UHE Canoas I) diferentemente da maioria dos reservatórios do rio Paranapanema, recebe em sua margem esquerda, seus principais afluentes: os rios Tibagi e o das Cinzas. Em seu estudo sobre a estratégia reprodutiva de espécies de peixes, realizou coletas sazonais no período de 2001 a 2004 em quatro pontos diferentes deste reservatório. Sendo que obteve maior abundância de *P. lineatus* no ponto de coleta próximo a foz do rio das Cinzas, também observou que o índice de atividade reprodutiva (IAR) foi mais acentuado no verão, e que a atividade reprodutiva foi considerada muito intensa nesse ponto de coleta que é a porção lótica do reservatório.

Os dados obtidos no presente estudo, com dois tipos diferentes de marcadores de DNA demonstraram um alto índice de variabilidade genética, assim como uma baixa diferenciação genética entre os agrupamentos de *P. lineatus* coletados nas escadas de transposição das UHEs Canoas I e Canoas II evidenciando a composição de uma única população. Tais dados indicam que a população de *P. lineatus* analisada neste estudo somente pode ser proveniente de uma população maior localizada no reservatório de Capivara o qual tem como mantenedores os rios Tibagi e das Cinzas, uma vez que a montante da UHE de Canoas I não existe tributários de maior porte. Fica claro, portanto que os trechos à jusante do Complexo Canoas, que guardam algumas características lóticas, e os tributários que ainda possuem essa conformação estão desempenhando um importante papel na manutenção da variabilidade genética e estrutura populacional dos estoques naturais de *P. lineatus*.

Segundo Agostinho e Gomes (2005) na maioria dos casos os mecanismos de transposição não constituem instrumentos válidos para conservação dos estoques. As exceções estão restritas aos casos em que eles são construídos com o objetivo de permitir o fluxo gênico de populações de amplo *home range*, fragmentadas pela barragem. Nesses casos, essas transposições devem ser controladas por estudos genéticos que indiquem a sua necessidade e ainda assim devem ser implantadas apenas se os trechos de rio a montante ou em tributários laterais comportarem áreas de desova, criadouros naturais e áreas de alimentação.

Park et al. (2003) encontraram evidências similares estudando espécies endêmicas ameaçadas pela construção da represa de Three Gorges localizada no rio Yangtze na China. Relataram a importância de alguns tributários deste rio como reservas potenciais de espécies endêmicas, mas reforçaram que alguns destes tributários, como os rios Jinsha e Jialing podem não constituir reservas sustentáveis para a manutenção destas espécies devido à grande interferência antrópica decorrente da construção de novas usinas hidrelétricas nestes rios.

Os dados obtidos por Orsi (2005) indicam que *P. lineatus* se reproduz justamente quando as escadas de transposição das UHEs de Canoas I e Canoas II estão abertas. Este fato implica numa migração equivocada dos peixes para as áreas a montante do rio Paranapanema (reservatórios de Canoas I e II), visto que as áreas a montante nos rios das Cinzas e Tibagi possuem áreas ainda bem preservadas de matas ciliares e de lagoas marginais, mais propícias para a reprodução.

Aliando os dados de Orsi 2005, de Britto e Sirol (2005) aos resultados obtidos por este estudo, é possível se fazer um diagnóstico a curto e em

longo prazo das implicações causadas pela construção destas escadas de transposição. Inicialmente, a existência de uma forma de ascensão dos peixes para áreas a montante, sugeria que o ciclo reprodutivo da espécie estava sendo continuado, então em curto prazo, este mecanismo de transposição estava cumprindo com os seus objetivos. Porém, analisando todos esses dados em conjunto, é possível estimar que a longo prazo, esta medida mitigatória imposta e implementada poderá resultar numa depleção generalizada dos estoques de *P. lineatus*, principalmente a jusantes dos reservatórios, a despeito da grande variabilidade genética e do esforço reprodutivo que esta espécie apresenta. Em assim sendo as escadas de transposição de peixes instaladas não estão cumprindo o objetivo de dar sustentabilidade a este ecossistema.

Desta forma algumas sugestões de manejo que possam contribuir com a preservação dos estoques naturais de *P. lineatus* podem ser feitas: tendo em vista que os espécimes que transpõem as escadas de Canoas I e Canoas II são provenientes do reservatório Capivara torna-se imprescindível preservar os seus principais afluentes, rio das Cinzas e Tibagi com o objetivo de manter a constante reposição dos estoques naturais de curimbas, bem como de outras espécies, por exemplo *Salminus brasiliensis* (Lopes 2005) e *Leporinus friderici* (Ashikaga 2005) dessa mesma região.

Além disto, pelo menos a escada de transposição de Canoas I, deveria permanecer fechada no período compreendido entre primavera e verão, época de reprodução de *P. lineatus* e outras espécies migradoras, pois assim, os peixes migrariam somente do reservatório de Capivara para os dois grandes afluentes onde encontrariam condições favoráveis para a conclusão de seu ciclo reprodutivo.

A partir da população de *P. lineatus* presentes no reservatório, Capivara, doador da população que transpõe as escadas, seriam então coletados espécimes que serviriam como estoques fundadores e através da reprodução assistida produzir alevinos que seriam utilizados como estoques repovoadores das áreas à montante, reservatórios de Canoas I e Canoas II.

Por fim, é imprescindível dar continuidade a estudos, como o realizado neste trabalho, para que as atividades de manejo possam se basear sempre em estudos científicos recentes já que o referido meio ambiente sofre constantes mudanças e grandes impactos antrópicos.

4 CONCLUSÕES

- ✓ As estimativas de variabilidade genética da espécie *Prochilodus lineatus* no Complexo Canoas se mostraram elevadas, o que pode ser atribuído a manutenção de uma grande população destes peixes graças à eficiência de sua estratégia reprodutiva.
- ✓ Os parâmetros genéticos estimados por meio dos marcadores moleculares RAPD e microssatélite, utilizados neste estudo para as análises de *Prochilodus lineatus* de Canoas I e de Canoas II demonstraram uma alta similaridade genética entre os diferentes grupos analisados, indicando a formação de uma única população de *Prochilodus lineatus* no Complexo Canoas;
- ✓ Os resultados obtidos mostram a importância de se utilizar um tamanho amostral adequado, pois grupos de indivíduos com tamanhos discrepantes podem favorecer resultados não condizentes com a realidade;
- ✓ Os espécimes de *P. lineatus* que realizam a transposição são provenientes do reservatório Capivara, que tem como afluentes os rios das Cinzas e Tibagi. A médio e longo prazo as escadas de transposição de peixes instaladas nas UHEs de Canoas I e Canoas II poderão causar depleção nos estoques naturais desses rios, pela não concretização do ciclo reprodutivo;
- ✓ Para a amenização do problema relativo aos estoques naturais ressalta-se a importância da preservação destes afluentes, bem como a fiscalização na região, garantindo os limites de pesca e exploração agrícola como tentativa de minimizar a degradação deste ecossistema.

- ✓ Mais estudos científicos, como o realizado no presente trabalho, devem ser propostos com o objetivo de auxiliar na indicação de atividades de manejo para a recuperação deste ecossistema, visto que o referido meio ambiente está submetido a constantes mudanças e grandes impactos antrópicos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho AA e Gomes LC (2005) O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. In: Nogueira MG, Henry R e Jorcin A (orgs) Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata. São Carlos: Ed. Rima, pp 23-55

Agostinho AA, Gomes LC, Fernandez DR e Suzuki HI (2002) Efficiency of fish ladders for a neotropical ichthyofauna. *River Research and Applications* 18: 299-306

Agostinho AA, Julio Jr HF e Borghetti JR (1992) Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. *Revista Unimar* 14: 89-107

Almeida FS, Fungaro MHP e Sodr e LMK (2001) RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi river. *Journal of Zoology* 253: 113-120

Ashikaga FY (2005) Análise da estrutura genética de *Leporinus friderici* (Pisces, Characiformes) nas escadas de transposi o de peixes das UHEs do Complexo Canoas - rio Paranapanema. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina

B rtfai R, Egedi S, Yue GH, Kovács B, Urb nyi B, Tam s G, Horv th L e Orb n L (2003) Genetics analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture* 219: 157-167

Black B (1997) RAPDFst 4.0.1. A Fortran Program to estimate F_{st} and effective migration rates among subpopulations using RAPD-PCR files. Colorado State University

Borghetti JR, Nogueira SVG, Borghetti NRB e Canzi C (1994) The fish ladder at the Itaipu Binational hydroelectric complex on the Paraná river, Brazil. *Regulated Rivers* 9: 127-130

Britto SG e Sirol RN (2005) Transposição de peixes como forma de manejo: as escadas do Complexo Canoas, médio rio Paranapanema, bacia do Alto Rio Paraná. In: Nogueira MG, Henry R e Jorcin A (orgs) *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata*. São Carlos: Ed. Rima, pp 285-304

Carosfeld J, Godinho PH, Zaniboni Filho E e Harvey BJ (2003) Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology* 63: 472-489

Castro RMC e Vari RP (2003) Family Prochilodontidae (Flannel mouth characiforms) In: Reis RE, Kullander OS e Ferraris Jr CJ (eds) *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*, EDIPUCRS, Porto Alegre. pp 65-70

Coelho ASG (2000) Software BOOD: Versão 2.0 Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia: UFG

Díaz V, Muniz LM e Ferrer E (2001) Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicarágua populations of *Pinus oocarpa*. *Molecular Ecology* 10: 2593-2603

Duke Energy – Geração Paranapanema (2003) Peixes do Rio Paranapanema. São Paulo: Ed. Horizonte Geográfico

Excoffier L, Smouse PE e Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data *Genetics* 131: 479-491

Excoffier L, Laval G e Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50

Godoy MP (1975) Peixes do Brasil. Subordem CHARACOIDEI. Bacia do Rio Mogi Guassu. Ed. Franciscana. v. 1. pp. 1-216

Grant WAS e Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The Journal of Heredity* 89:415-426

Hatanaka T e Galetti Jr PM (2003) RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetic and Molecular Biology* 26: 19-25

Hatanaka T, Henrique-Silva F e Galleti Jr PM (2002) A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenetic and Genomic Research* 98: 308-310

Hedman M, Pimenoff V, Lukka M, Sistonen P e Sajantil A (2004) Analysis of 16 Y STR loci in the Finnish population reveals a local reduction in the diversity of male lineages. *Forensic Science International* 142: 37–43

Herwerden LV, Benzie J e Davies C (2003) Microsatellite variation and population genetic structure of the red throat emperor on the Great Barrier Reef. *Journal of Fish Biology* 62: 98-99

Hilsdorf AW e Petrere Jr M (2002) Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje* 30: 62-67

Isabel N, Beaulieu J, Thériault P e Bousquet J (1999) Direct evidence for biased diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology* 8: 477-483

Kunkel LH e Flores SA (1994) Reproducción de *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) Osteichthyes. Prochilodontidae: Hystologia y escala de maduración de ovários. *Boletim do Instituto de Pesca* 21: 83-94

Leuzzi MSP, Almeida SF, Orsi ML e Sodr e LMK (2004) Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetic and Molecular Biology* 27: 355 -362

Liebers D e Helbig AJ (2002) Phylogeography and colonization history of Lesser Black-backed Gulls (*Larus fuscus*) as revealed by mtDNA sequences. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 1021-1033

Lopes CM (2005) Análise da estrutura genética de *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characiformes) no Complexo Canoas – Rio Paranapanema, como ferramenta de avalia o das escadas de transposi o de peixes. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina

Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA e Weatherhead PJ (2000) A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the Massasauga rattlesnake. *Journal of Heredity* 91: 458-463

Lowe A, Harris S e Ashton P. (2004) Ecological genetics. Design, analysis and application. Blackwell Publishing

Lynch M e Milligan BG (1994) Analysis of population structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99

Miller MP (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics* 89: 583-590

Orsi ML (2005) Caracterização das estratégias reprodutivas na assembléia de peixes do reservatório de Capivara, rio Paranapanema, região sudeste, Brasil. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu

Park Y, Chang J, Lez S, Cao W e Brosse S (2003) Conservation strategies for endemic fish species threatened by the Three Gorges Dam. *Conservation Biology* 17: 1748-1758

Perez-Sweeney BM, Rodrigues FP e Melnick DJ (2003) Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: Cullen LJ, Valadares-Padua C e Rudan R (orgs) Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre. Ed. UFPR. pp 343-380

Pinto SIC, Souza AM e Carvalho D (2004) Genetic variability by isozymes in populations of *Copaifera langsdorffii* Desf. in two fragments of riparian forest. *Scientia Florestalis* 65: 40-48

Ramagosa E, Narahara MY e Godinho HM (1985) Tipo de desova do curimatá, *Prochilodus scrofa* STEIND. 1881, do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, São Paulo. Boletim do Instituto de Pesca 12: 1-5

Ramos JV (2004) Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no Complexo Canoas – rio Paranapanema, como ferramenta de avaliação da eficiência das escadas de transposição de peixes. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina

Raymond M e Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86: 248-249

Revaldaves E, Renesto E e Machado MFPS (1997) Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná River. Brazilian Journal of Genetics 20: 381-388

Rohlf FJ (2002) NTSYS-pc. Numerical taxonomy system, v. 2.1 Exeter publishing Ltd.: Setauket, NY

Santos CM, Ferreira RAR e Henry R (2005) Alterações na organização da comunidade bentônica no Complexo Canoas (Rio Paranapanema-SP) durante as fases pré e pós-enchimento. In: Nogueira MG, Henry R e Jorcin A (orgs) Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata. São Carlos: Ed. Rima, pp 23-55

Schnabel A, Beerli P, Estoup A e Hillis D A guide to software packages for data analysis in molecular ecology. Disponível on line no endereço: <http://evolution.genetics.washington.edu/PBhtmls/NATO/DAChap.pdf>. Acessado em: 29 Mar 2006

Sekine SE, Prioli AJ, Prioli SMAP e Júlio Jr HF (2002) Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paraná River. *Acta Scientiarum* 24: 507-512

Sivasundar A, Bermingham E e Ortí G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407-418

Slatkin M e Barton HH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368

Sofia SH, Silva CRM, Galindo BA, Almeida FS, Sodré LMK e Martinez CBR (2006) Population genetic structure of *Astyanax scabripinis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia* 553: 245-254

Thomaz SM, Roberto MC e Bini LM (1997) Caracterização limnológica dos ambientes aquáticos e influência dos níveis fluviométricos. In: Vazzoler AEAM, Agostinho AA e Hahn NS (eds) A planície de inundação do alto rio Paraná. Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. EDUEM, Maringá. pp 73-102

Torres RA, Matoso DA e Artoni RF (2004) Genética de peixes neotropicais. *Biologia Molecular de peixes neotropicais. Biologia e Saúde* 10: 27-37

Vazzoler AEAM (1996) *Biologia de reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Ed. EDUEM.

Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations*. v. 4. Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press. pp 79-103

Yeh FC, Yang R e Boyle T (1999) POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research

Zenatti PP (2003) *Análise da variabilidade genética do peixe *Prochilodus lineatus* através de marcadores microssatélites*. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. Manejo e monitoramento de recursos pesqueiros: perspectivas para o reservatório Segredo. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. (Eds.) **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para manejo**. Maringá: EDUEM. p. 319-364. 1997.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Orgs.) **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. São Carlos: Ed. Rima, p. 23- 55. 2005.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; FERNANDEZ, D.R.; SUZUKI, H.I. Efficiency of fish ladders for a neotropical ichthyofauna. **River Research and Application** v. 18: p. 299-306. 2002.
- AGOSTINHO, A.A.; JULIO Jr., 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. 89-107. 1992.
- ALI, B.A.; HUANG, T.; QIN, D.; WANG, X. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. **Reviews in Fish Biology and Fishery** v. 14: p. 443-453. 2004.
- ALMEIDA, F.S. **Estudo da estrutura genética de *Pimelodus* (Pisces-Siluriformes) através do uso de RAPD e DNAr 5S com ênfase na bacia do rio Paraná**. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2002.
- ALMEIDA, F.S.; FUNGARO, M.H.P.; SODRÉ, L.M.K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi river. **Journal of Zoology** v. 253: p.113-120. 2001.
- ALMEIDA, F.S.; SODRÉ L.M.K.; CONTEL, E.P.B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). **Genetic and Molecular Biology** v. 26: p. 301-305. 2003.

ALZUGUIR, F. **Histórico da legislação referente à proteção dos recursos íctílicos de água doce, seminário sobre fauna aquática e o setor elétrico brasileiro**, MME - Ministério de Minas e Energia, ELETROBRÁS - Centrais Elétricas Brasileiras S.A., COMBASE – Comitê Coordenador das Atividades de Meio Ambiente do Setor Elétrico, Rio de Janeiro , Brasil, dezembro, 1994.

ASHIKAGA, F.Y. **Análise da estrutura genética de *Leporinus friderici* (Pisces, Characiformes) nas escadas de transposição de peixes das UHEs do Complexo Canoas - rio Paranapanema**. 2005. 83p. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

BAGLEY, M.J; ANDERSON, S.L.; MAY, B. Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints. **Ecotoxicology** v. 10: p. 239-244. 2001.

BARMAN, H.K.; BARAT, A.; YADAV, B.M.; BANERJEE, S.; MEHER, P.K.; REDDY, P.V.G.K.; JANA, R.K. Genetic variation between four species of indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. **Aquaculture** v. 217: p. 115-123. 2003.

BÁRTFAI, R.; EGEDI, S.; YUE, G.H.; KOVÁCS, B.; URBÁNYI, B.; TAMÁS, G.; HORVÁTH, L.; ORBÁN, L. Genetics analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. **Aquaculture** v. 219: p.157-167. 2003.

BLACK, B. **RAPDFst 4.0.1**. A Fortran Program to estimate F_{st} and effective migration rates among subpopulations using RAPD-PCR files. Colorado State University. 1997.

BORGHETTI, J.R.; NOGUEIRA, S.V.G.; BORGHETTI, N.R.B.; CANZI C. The fish ladder at the Itaipu Binational hydroelectric complex on the Paraná river, Brazil. **Regulated Rivers** v. 9: p. 127-130.1994.

BRITTO, S.G.; SIROL, R.N. Transposição de peixes como forma de manejo: as escadas do Complexo Canoas, médio rio Paranapanema, bacia do Alto rio Paraná. In: NOGUEIRA, M. G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Orgs.) **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. São Carlos: Ed. Rima p. 285-304. 2005.

CAROSFELD, J.; GODINHO, P.H.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology** v. 63: p. 472-489. 2003.

CARVALHO, G.R. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. **Journal of Fish Biology** v. 43: p. 53-73. 1993.

CASTILHO, R. (in prep). **Genética de populações: noções básicas com aplicação em aquacultura**. Notas para a disciplina de Genética do Mestrado Internacional em Aquacultura, Gran Canaria, Spain. Fonte eletrônica (www.ualg.pt/~rcastil/Livro%20GP%20Canárias%20Rita%20Castilho.doc).

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Family Prochilodontidae (flannel mouth characiforms) In: REIS, R. E.; KULLANFER, O. S.; FERRARIS Jr., C. J. (Eds.) **Check list of the freshwater fishes of south and central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre. p. 65-70. 2003.

CESP, **Complexo Canoas: programa de monitoramento da qualidade da água e manejo da ictiofauna**. 2000.

CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis. **Acta Scientiarum** v. 23: p. 445-451. 2001.

CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS B.; VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture** in press. 2006.

COELHO, A.S.G. **Software BOOD: Versão 2.0** Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia: UFG, 2000.

CURTIS, J.M.R.; TAYLOR, E.B. The genetic structure of coastal giant salamanders (*Dicamptodon tenebrosus*) in a managed forest **Biological Conservation** v. 115: p. 45-54. 2003.

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 das bacias**. Tese de doutorado - Universidade Federal de São Carlos; São Carlos-SP. 2003.

DÍAZ, V.; MUNIZ, L.M.; FERRER, E. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicarágua populations of *Pinus oocarpa*. **Molecular Ecology** v. 10: p. 2593-2603. 2001.

DUKE ENERGY – GERAÇÃO PARANAPANEMA. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo. Ed. Horizonte Geográfico. 112 p. 2003.

EPA - United States Environmental Protection Agency, 2001. **Molecular indicators of genetic diversity in fish**. <http://www.epa.gov/nerleerd/gendiv.htm>. Acesso em 07/05/2005. Acesso em: 15/02/2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** v. 131: p. 479-491. 1992.

EXCOFFIER, L. G.; LAVAL, A.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** v.1: p. 47-50. 2005.

FERNANDEZ, D.R.; AGOSTINHO, A.A.; BINI, L.M. Selection of an experimental fish ladder located at the dam of the Itaipu Binacional, Paraná river, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v. 47: p. 579-586. 2004.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. p. 37-52. 1998.

GARCÍA DE LEÓN, F.J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of Europe sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Molecular Ecology** v. 6: p. 51 - 62. 1997.

GARNER, T.W.J.; ANGELONE, S.; PEARMAN, P.B. Genetic depletion in Swiss populations of *Rana latastei*: conservation implications. **Biological Conservation** v. 114: p. 371 -376. 2003.

GRANT, W.A.S.; BOWEN, B.W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **The Journal of Heredity** v. 89: p. 415-426. 1998.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil. Subordem Characoidei. Bacia do rio Mogi Guassu**. Ed. Franciscana. v. 1: p. 1-216. 1975.

GOULÃO, L.; CABRITA, L.; OLIVEIRA, C.M.; CAMPOS, L.A.O.; PERUQUETI, R.C. Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetics similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. RAPD and AFLP analysis of apples. **Euphytica** v. 119: p. 259 – 270. 2001.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. 3^a ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 542 p. 1997.

HASSANIEN, H.A.; ELNADY, M.; OBEIDA, A.; ITRIBY, H. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Aquaculture Research** v. 35: p. 587 – 593. 2004.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P.M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetic and Molecular Biology** v. 26: p. 19 - 25. 2003.

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALLETTI Jr., P.M. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. **Cytogenetics and Genome Research** v. 98: p. 308 -310. 2002.

HEDMAN, M.; PIMENOFF, V.; LUKKA, M.; SISTONEN, P.; SAJANTIL, A. Analysis of 16 Y STR loci in the Finnish population reveals a local reduction in the diversity of male lineages. **Forensic Science International** v. 142: p. 37–43. 2004.

HENDRY, A.P.; WENBURG, J.K.; BENTZEN, P.; VOLK, E.C.; QUINN, T.P. Rapid evolution of reproductive isolation in the wild: evidence from introduced salmon. **Science** v. 290: p. 516 - 518. 2000.

HERWERDEN, L.V.; BENZIE, J.; DAVIES, C. Microsatellite variation and population genetic structure of the red throat emperor on the Great Barrier Reef. **Journal of Fish Biology** v. 62: p. 987 - 99. 2003.

HILSDORF, A.W.; PETRERE, M. Jr. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje** v. 30: p. 62 – 67. 2002.

ISABEL, N.; BEAULIEU, J.; THÉRIAULT, P.; BOUSQUET, J. Direct evidence for biased diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. **Molecular Ecology** v. 8: p. 477-483. 1999.

ISLAM, S.M.; ALAM, M.S. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of four different populations of the Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton) **Journal of Applied Ichthyology** v. 20: p. 407- 412. 2004.

JESUS, C.M.; GALETTI Jr., P.M.; VALENTINI, S.R.; MOREIRA-FILHO, O. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes; **Genetica** v. 118: p. 25 - 32, 2003.

KJOLNER, S.; SASTAD, S.M.; TABERLET, P.; BROCHMANN, C. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. **Molecular Ecology** v.13: p. 81-86. 2004

KUNKEL, L.H.; FLORES, S.A. Reproducción de *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) Osteichthyes. Prochilodontidae: Hystologia y escala de maduración de ovários. **Boletim do Instituto de Pesca** v. 21: p. 83-94. 1994.

LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon based on variation at microsatellite loci: implication for conservation. **Molecular Ecology** v. 12: p. 2875 - 2883. 2003.

LEVIN, P.S.; SCHIEWE, M.H. Preserving salmon biodiversity. **American Science** v. 3: p. 220 - 227. 2001.

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

LIEBERS, D.; HELBIG, A. J. Phylogeography and colonization history of Lesser Black-backed Gulls (*Larus fuscus*) as revealed by mtDNA sequences. **Journal of Evolutionary Biology** v. 15: p. 1021-1033. 2002.

LIU, Z.J.; CORDES, J.F. DNA markers technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture** v. 238: p. 1-37. 2004.

LOPES, C.M. **Análise da estrutura genética de *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characiformes) no Complexo Canoas – rio Paranapanema, como ferramenta de avaliação das escadas de transposição de peixes.** 2005. 67p. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

LOUGHEED, S.C.; GIBBS, H.L.; PRIOR, K.A.; WEATHERHEAD, P.J. A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the Massasauga rattlesnake. **Journal of Heredity** v. 91: p. 458-463. 2000.

LOWE-McCONNEL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes Tropicais** Ed. EDUSP. 535 p. 1999.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics. Design, analysis and application** Blackwell Publishing. 326 p. 2004.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. Analysis of population structure with RAPD markers. **Molecular Ecology** v. 3: p. 91 - 99. 1994.

MEYER, A.S.; GARCIA, A.A. F; SOUZA, A.P. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in mayze (*Zea mays* L). **Genetics and Molecular Biology** v. 27: p. 83-91. 2004.

MILLER, M.P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3:** A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. 1997.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specifics synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. **Methyl Enzymology** v. 55: p. 335-350. 1987.

NEI, M. Estimation of average heterozigosity and genetic distance from a small number of individual. **Genetics** v. 89: p. 583-590. 1978.

NELSON, J.S. **Fishes of the world.** 3.ed. New York: Ed. John Wiley and Sons. p.139 -150. 1994.

NIELSEN, J.L. Population genetic and the conservation and management of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Canadian Journal of Fish Aquatic Science** v. 55: p. 145-152. 1998.

NOGUEIRA, M.G; JORCIN, A.; VIANNA, N.C.; BRITTO, Y.C.T. Reservatórios em Cascata e os Efeitos na Limnologia e Organização das Comunidades Bióticas (Fitoplâncton, Zooplâncton e Zoobentos) – Um estudo de caso no rio Paranapanema. In: NOGUEIRA, M. G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Orgs). (Orgs.) **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. São Carlos: Ed. Rima p 83-125. 2005.

O'CONNELL, M.; DILLON, M.C.; WRIGHT, J.M. Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). **Molecular Ecology** v. 7: p. 357-363. 1998.

OLIVEIRA, C.; SABOYA, S.M.R.; FORESTI, F.; SENHORINI, J.A.; BERNARDINO, G. Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity** v. 79: p. 473- 476. 1997.

OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; PAVANELLI, C.S.; JÚLIO Jr., H.F.; PANARARI, R.S. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Paraná river foodplain of Brazil. **Genetica** v. 115: p. 259-267. 2002.

ORMEROD, S.J. Current issues with fish and fisheries: editor's overview and introduction. **Journal of Applied Biology** v. 40: p. 204-213. 2003.

ORSI, M.L. **Caracterização das estratégias reprodutivas na assembléia de peixes do reservatório de Capivara, rio Paranapanema, região sudeste, Brasil**. 114 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, 2005.

PAIVA, M.P.; ANDRADE-TUBINO, M.F.;GODOY, M.P. **As represas e os peixes nativos do rio Grande – Bacia do Paraná- Brasil**. p. 56-57. 2002.

PARK, Y.; CHANG, J.; LEZ, S.; CAO, W.; BROSSE, S. Conservation strategies for endemic fish species threatened by the Three Gorges Dam. **Conservation Biology** v. 17: p. 1748-1758. 2003.

PAULS, E.; BERTOLLO, A.C. Evidence for a system of a supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steinadachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Caryologia** v. 36: p. 307-314,1983.

PEREZ-SWEENEY, B.M.; RODRIGUES, F.P.; MELNICK, D.J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN, L.J.;

VALADARES-PADUA, C.; RUDRAN, R. (Orgs.) **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Ed. UFPR, p. 343-380, 2003.

PINTO, S.I.C.; SOUZA, A.M.; CARVALHO, D. Genetic variability by isozymes in populations of *Copaifera langsdorffii* Desf. In two fragments of riparian forest. **Scientia Florestalis** n. 65: p. 40-48. 2004.

PRESA, P.; GUYOMARD, R. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. **Journal of Fish Biology** v. 49: p.1326-1329. 1996.

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JULIO Jr., H. F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetic and Molecular Biology** v.25: p. 421-430. 2002.

RAMAGOSA; E.; NARAHARA, M.Y.; GODINHO, H.M. Tipo de desova do curimatá, *Prochilodus scrofa* STEIND. 1881, do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca** v. 12: p. 1-5. 1985.

RAMOS, J.V. **Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no Complexo Canoas – rio Paranapanema, como ferramenta de avaliação da eficiência das escadas de transposição de peixes**. 2004. 56p. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity** v. 86: p. 248-249. 1995.

REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná River. **Brazilian Journal of Genetics** v. 20: p. 381-388. 1997.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy system, v. 2.1 **Exeter publishing Ltd.**: Setauket, NY. 2002.

RUZZANTE, D.E.; HANSEN, M.M.; MELDRUP, D. Distribution of individual inbreeding coefficients, relatedness and influence of stocking on native anandromous brown trout (*Salmo trutta*) population structure. **Molecular Ecology** v. 10: p. 2107-2128. 2001.

SANTOS, C. M.; FERREIRA, R. A. R.; HENRY, R. Alterações na organização da comunidade bentônica no Complexo Canoas (Rio Paranapanema-SP) durante as fases pré e pós-enchimento . In: NOGUEIRA, M. G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Orgs.) **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. São Carlos: Ed. Rima, p. 23- 55. 2005.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research** v. 20: p. 211-215. 1992.

SCHNABEL, A.; BEERLI, P.; ESTOUP, A.; HILLIS, D. **A guide to software packages for data analysis in molecular ecology**. Disponível on line no endereço: <http://evolution.genetics.washington.edu/PBhtmls/NATO/DACchap.pdf>. Acessado em: 29.03.2006.

SEKINE, S. E.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; JÚLIO Jr, H. F. Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paraná River. **Acta Scientiarum** v. 24: p. 507- 512. 2002.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G.. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology** v.10: p: 407- 418. 2001.

SLATKIN, M.; BARTON, H.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution** v. 43: p. 1349-1368. 1989.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de Genética 2^a**. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 756 p. 2001.

SOFIA, S.H.; SILVA, C.R.M.; GALINDO, B.A.; ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K.; MARTINEZ, C.B.R. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from na urban stream. **Hydrobiologia** v. 553: p. 245-254. 2006.

SOLE-CAVA, A.J. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução** Ribeirão Preto: Ed. Holos. p. 171-190. 2001.

STOW, A.J.; BRISCOE, D.A. Impact of habitat fragmentation on allelic diversity at microsatellite loci in Cunningham's shink (*Ergenia cunninghami*); a preliminary study. **Conservation Genetics** v. 6: p. 455-459. 2005.

THOMAZ, S.M.; ROBERTO, M.C.; BINI, L.M. Caracterização limnológica dos ambientes aquáticos e influência dos níveis fluviométricos. In: VAZZOLER, A.E. A.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Eds.) **A planície de inundação do alto rio Paraná. Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. EDUEM, Maringá. P. 73 -102. 1997.

TORRES, R.A.; MATOSO, D.A.; ARTONI, R.F. Genética de peixes neotropicais. *Biologia Molecular de peixes neotropicais*. **Biologia e Saúde** v. 10: p. 27-37. 2004.

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia de reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 169p. 1996.

WASKO, A.P.; GALETTI Jr., P.M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiologia** v. 474: p. 131-137. 2002.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research** v. 18: p. 7213-7218. 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.; DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research** v. 18: p. 6531- 6535. 1990.

WRIGHT, S. The genetical structure of population. **Annals of Eugenics** v. 15: p. 323-354. 1951.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press. v. 4: p. 9-103. 1978.

XU, C-Y.; ZHANG, W-J.; FU, C-Z.; LU, B-R. Genetic diversity of alligator weed in China by RAPD analysis. **Biodiversity and Conservation** v. 13: p. 637-645. 2003.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE version 1.31: **Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research. 1999.

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

ZENATTI, P.P. **Análise da variabilidade genética do peixe *Prochilodus lineatus* através de marcadores microssatélites**. 2003. 48p. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos.

ZHOU, H.; XIE, Z.; GE, S. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China. **Theory of Applied Genetics** v. 107: p. 332-339. 2003.

ZOCCHI, P. **Rio Paranapanema : da nascente à foz** – São Paulo: Ed. Audichromo. p. 130. 2002.

ANEXOS

ANEXO 1
Coleta de amostras

ANEXO 1 – Coleta de amostras

Foram coletados 216 indivíduos da espécie *Prochilodus lineatus* das populações naturais das escadas de transposição das UHEs de Canoas I e Canoas II no rio Paranapanema. As coletas foram realizadas no período de Março de 2003 a Março de 2005 sempre respeitando a época de piracema que abrange o começo do mês de setembro de um ano até o fim do mês de março do ano seguinte (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados das coletas de *Prochilodus lineatus* realizadas nas UHEs Canoas I e Canoas II, durante os anos de 2003, 2004 e 2005.

| Espécie | Barragem | Localidade | Data da Coleta | Quantidade |
|-----------------------------|-----------|------------|----------------|------------|
| <i>Prochilodus lineatus</i> | Canoas I | Escada | 25/03/2003 | 17 |
| | | | 30/10/2003 | 1 |
| | | | 20/11/2003 | 12 |
| | | | 11/12/2003 | 11 |
| | | | 16/12/2004 | 31 |
| | | | 10/01/2005 | 1 |
| | | | 17/02/2005 | 6 |
| | Canoas II | Escada | 31/10/2003 | 1 |
| | | | 21/11/2003 | 1 |
| | | | 12/12/2003 | 36 |
| | | | 19/11/2004 | 1 |
| | | | 29/11/2004 | 2 |
| | | | 17/12/2004 | 26 |
| | | | 11/01/2005 | 25 |
| | | | 18/03/2005 | 45 |
| TOTAL | ----- | ----- | ---- | 216 |

O esforço de coleta foi padronizado, e consistia no fechamento do portão da escada em sua porção montante, desta forma a corrente de água era interrompida, esperava-se um tempo para que o nível de água baixasse o suficiente para que a equipe de coleta pudesse entrar nos degraus-tanque, o portão à jusante da escada também era fechado e os espécimes que permaneciam presos na escada

eram então coletados para retirada das amostras. Foram utilizadas redes de arrasto tipo picaré para a captura dos exemplares.

O tecido muscular foi retirado da parte lateral caudal esquerda ou da nadadeira adiposa de cada indivíduo. As amostras de músculo foram embaladas em papel alumínio, devidamente identificadas com a numeração do indivíduo, e guardadas em um freezer a -20°C para posterior extração do DNA. As amostras de nadadeiras foram também identificadas individualmente e conservadas em álcool comercial. Os indivíduos coletados foram etiquetados e estão conservados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina. Os dados individuais de cada exemplar coletado foram registrados em um caderno de anotações, com número de cada exemplar, espécie, local e data de coleta.

ANEXO 2
Extração e quantificação de DNA

ANEXO 2 – Extração e quantificação de DNA

Para extração do DNA das amostras, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Almeida, Fungaro e Sodré (2001), que consiste em macera o minuciosa do tecido utilizando-se de placa de Petri estéril, tesoura e pinça. Após tal macera o o tecido foi colocado em microtubo, identificado com a numera o de cada amostra, contendo tampão TE9 + SDS (Tris-HCl 500mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 10 mM, e 1% de SDS), (600 a 800 μ L, dependendo da quantidade de tecido) que foi preparado no momento do uso a partir das solu es estoques. Nos microtubos com tampão e tecido, foram acrescentados 5 μ L de proteinase K (20 mg de Proteinase K em 1 ml de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; acetato de cálcio 3 mM), homogeneizados e levados para o banho-maria a 65 C por 24 horas, para que ocorresse a dissolu o total do tecido. O passo seguinte consistiu em acrescentar um volume de tampão fenol (600 a 800 μ L, dependendo da quantidade de tampão TE9 utilizada), realizar o processo de homogeneiza o e levar   microcentrífuga por 10 minutos a 10.000 rpms.

A fase aquosa (sobrenadante) de cada microtubo foi transferida para outro microtubo ao qual foi adicionado um volume de clorofane (1: 1 fenol – clorofil) (600 a 800 μ L). Após homogeneiza o os microtubos foram levados novamente a microcentrífuga por outros 10 minutos a 10.000 rpms.

Novamente a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para outro microtubo que recebeu um volume de clorofil (24: 1 clorofórmio –  lcool isoamílico) (600 a 800 μ L). Após homogeneiza o os microtubos foram levados a microcentrífuga por mais 10 minutos a 10.000 rpms.

Logo após, a fase aquosa (sobrenadante) foram colocadas em novos microtubos que receberam 10 % do volume inicial (600 a 800 μL) de NaCl 3M, mais duas vezes e meia este volume inicial de etanol absoluto gelado. Estes microtubos sofreram inversões cuidadosas para a precipitação do DNA, e foram mantidos no freezer a -20°C por 12 horas.

Esta solução contendo o DNA foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpms para a fixação do *pellet* no fundo dos microtubos. Em seguida o conteúdo aquoso destes microtubos foi vertido, restando apenas o DNA.

O DNA em *pellet* foi lavado com aproximadamente 100 μL de etanol 70 %. Este etanol foi descartado, vertendo-se cada um dos microtubos, que foram deixados em local protegido para a secagem do DNA por aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente.

Feita a secagem, o DNA foi solubilizado em tampão TE (3 mM Tris; 0,2 mM EDTA pH 8, 0) (cerca de 200 μL por microtubo). Esta solubilização prepara o DNA para ser diluído em 1/10, visando a sua quantificação.

A diluição 1/10 consistiu no seguinte: para um volume de 100 μL foram colocados 10 μL do DNA solubilizado e 90 μL de TE. A solução de DNA concentrado (estoque) foi guardada no freezer e a diluída, utilizada na quantificação.

A quantificação do DNA foi feita utilizando-se o aparelho fluorímetro *Dyna Quant 200* (Hoefer) e o procedimento de quantificação foi baseado na metodologia proposta pelo fabricante. As amostras já quantificadas foram novamente diluídas em tampão TE para se obter uma concentração final de DNA de 5 ng/ μL , as quais foram utilizadas para a elaboração das reações de amplificação.

ANEXO 3
Marcadores RAPD

ANEXO 3 – Marcadores RAPD

✓ Seleção de *primers*

Para a seleção foram utilizados 40 *primers* dos kits OPAC, OPX, OPC e OPW da Operon Technologies para averiguar quais *primers* ofereceriam a melhor qualidade e consistência no padrão de bandas para o estudo da espécie em questão. Foram selecionados 15 *primers*: OPW4, OPW5, OPW6, OPW7, OPW8, OPW9, OPAW10, OPW11, OPW18, OPC2, OPC7, OPX6, OPX17, OPAC6 e OPC15. Utilizados em cada análise genética realizada. Vale salientar que, por problemas eletroforéticos, o *primer* OPC7 não foi utilizado na análise genética de *Prochilodus lineatus* da escada de transposição de Canoas I.

✓ Amplificação do DNA

Para cada amostra foi preparada uma mistura de reação de 15 µL que continha: tampão de reação com 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl; pH 8,3; 0,25 mM de dNTP (Invitrogen); 3,33 mM de MgCl₂; 0,33 µM de *primer* (Operon Technologies); 0,75 U de Taq DNA Polimerase (EMBRAPA); 10 ng de DNA e água bidestilada para completar o volume (Tabela 2). Além disso, foi preparada uma reação adicional sem DNA que foi utilizada como controle negativo. As bandas que apareceram tanto no controle negativo quanto nas amostras, foram excluídas das análises.

Tabela 2 – Componentes da reação de amplificação do DNA e concentrações utilizadas na reação de RAPD.

| Componentes | Concentração estoque | Volume na reação (µL) | Concentração final |
|--------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| Água bidestilada | ----- | 2,85 | Qsp |
| Tampão de reação | 10 x | 1,5 | 1 x |
| dNTP | 2,5 mM | 1,5 | 250 µM |
| MgCl ₂ | 10 mM | 5,0 | 3,33 mM |
| <i>Primer</i> | 2,5 µM | 2,0 | 0,33 µM |
| Taq DNA polimerase | 5 U/1µL | 0,15 | 0,75 U |
| DNA | 5 ng/µL | 2,0 | 10 ng |
| Volume Total (µL) | --- | 15 | --- |

Cada microtubo recebeu, com um conta-gotas, uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação da mistura de reação durante o processo de amplificação do DNA, a qual foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ Research). A amplificação seguiu um programa composto de uma desnaturação inicial a 92°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos, cada um contendo as seguintes fases: 40 segundos a 92°C (desnaturação), 1 minuto e 30 segundos a 40°C (pareamento) e 2 minutos a 72°C (extensão), sendo que após todos os ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para testar a reprodutibilidade dos padrões de banda obtidos foram preparadas, separadamente, duas reações de amplificação utilizando 4 amostras aleatórias de *P. lineatus*. Em seguida os produtos amplificados foram aplicados em géis diferentes e submetidos às mesmas condições eletroforéticas. Os perfis de

bandas obtidos (Figura 1) foram comparados quanto à presença e ausência de bandas.

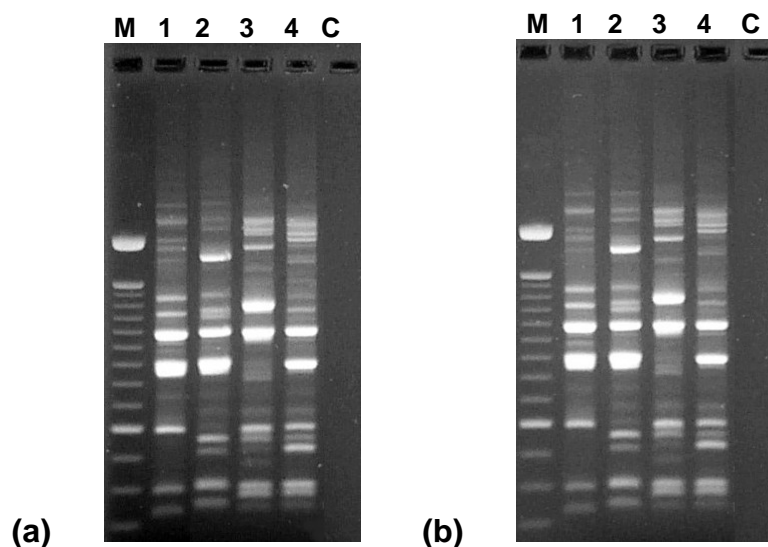


Figura 1 – Teste de reprodutibilidade da reação de amplificação para 4 amostras de *P. lineatus* através do *primer* OPW6. Em (a) e (b) estão os perfis obtidos para cada amplificação realizada, sendo M o marcador de peso molecular, 1-4 as amostras de *P. lineatus* utilizadas e C o controle negativo da reação.

✓ Análises eletroforéticas

Após a amplificação do DNA das amostras, foi necessário separar os fragmentos amplificados em gel de agarose 1,4 %. Tanto no preparo do gel quanto para uso nas cubas, o tampão utilizado foi o TEB 0,5X, diluído da solução 10x (Tris 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M e EDTA 0,01M, pH 8,3). Para a aplicação, foi adicionado às amostras 4 μ L de tampão de amostra (0,26 g de azul de bromofenol e 15 g de Ficoll para 100 mL de água destilada).

Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de 100 pb (Invitrogen). Foram mantidos 3 V/cm entre os eletrodos durante a corrida

eletroforética que se estendeu por aproximadamente 8 cm (cerca de 4 horas). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídeo (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), visualizado com transiluminador com luz ultravioleta e fotografado em filme preto e branco (T-MAX) e no sistema de fotodocumentação digital KODAK EDAS 290.

As fotos obtidas revelaram os perfis eletroforéticos dos indivíduos de cada população, que foram utilizados para as análises genéticas e estatísticas.

- Análise eletroforética de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II

A análise eletroforética do DNA amplificado, para obtenção de perfis de RAPD de *P. lineatus* coletados na escada de transposição de Canoas I foi realizada com 46 espécimes divididos em 4 grupos, conforme as respectivas datas de coleta (Tabela 3) que foram colocados lado a lado no mesmo gel.

Tabela 3 – Número de espécimes de *Prochilodus lineatus* analisados para cada data de coleta na escada de transposição da UHE Canoas I – rio Paranapanema.

| Data de coleta | Mar. 2003 | Nov. 2003 | Dez. 2004 | Jan. 2005 | Total |
|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|
| Grupos | A | B | C | D | --- |
| Nº de amostras | 14 | 14 | 13 | 5 | 46 |

Para a análise de *P. lineatus* provenientes da escada de transposição de Canoas II, foram utilizados 48 espécimes que também foram

divididos em 4 grupos conforme a data de coleta e colocados lado a lado no mesmo gel (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de espécimes de *Prochilodus lineatus* analisados para cada data de coleta na escada de transposição de Canoas II – rio Paranapanema.

| Data de coleta | Dez. 2003 | Dez. 2004 | Jan. 2005 | Mar. 2005 | Total |
|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|
| Grupos | E | F | G | H | --- |
| Nº de amostras | 12 | 12 | 12 | 12 | 48 |

- Análise eletroforética comparativa de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II

Com a finalidade de se obter dados comparativos entre os grupos de *Prochilodus lineatus* das duas escadas de transposição (Canoas I x Canoas II) foi realizada uma análise eletroforética interpopulacional, onde em um mesmo gel de agarose foram colocadas amostras de espécimes de todos os grupos de cada uma das escadas de transposição (Tabela 5).

Tabela 5 – Número de espécimes de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema, utilizados na análise comparativa.

| Localidades | CANOAS I | | | | CANOAS II | | | |
|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Mar. 2003 | Nov. 2003 | Dez. 2004 | Jan. 2005 | Dez. 2003 | Dez. 2004 | Jan. 2005 | Mar. 2005 |
| Grupos | A | B | C | D | E | F | G | H |
| Nº de amostras | 6 | 6 | 6 | 5 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Total | 23 | | | | 24 | | | |

✓ Análises genéticas

Os dados obtidos dos perfis eletroforéticos de RAPD foram introduzidos em programas computacionais na forma de variáveis binárias (presença ou ausência de banda). Cada loco foi tratado como um sistema de dois alelos, com somente um dos alelos por loco sendo amplificado por PCR, também se assumiu que os alelos dos diferentes locos não co-migram para a mesma posição em um gel e que os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (LYNCH; MILLIGAN, 1994).

A partir do programa computacional TFPGA 1.3 (MILLER, 1997) foram calculados, usando-se a correção de Lynch e Milligan (1994), os seguintes parâmetros: variabilidade genética estimada a partir da proporção de locos polimórficos (\bar{P}), usando critério de 95%; identidade e distância genética de Nei (1978) e teste exato de Fisher, aplicado para o cálculo de diferenças significativas das freqüências dos marcadores nas diferentes populações.

O software ARLEQUIN versão 3.0 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005) foi utilizado para quantificar a diversidade genética através do índice de diversidade nucleotídica (π_n) que estima a probabilidade de que dois nucleotídeos homólogos escolhidos ao acaso sejam diferentes (TAJIMA, 1983, NEI 1987 cf. EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). Assim, quanto maior a variação genética, maior esta probabilidade. Para estimar a distribuição da diversidade genética por meio das estimativas do F_{ST} entre populações (REYNOLDS et al. 1983, SLATKIN 1995 cf. EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005), e pela análise da variância molecular (AMOVA - EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992). A significância destes testes foi realizada pelo método de permutações aleatórias, com 1000 e 10000 permutações respectivamente. Para todas essas análises não é necessário assumir freqüências mendelianas, o que minimiza os desvios causados pela dominância dos marcadores RAPD (DÍAZ; MUNIZ; FERRER, 2001). O uso

deste programa para marcadores RAPD é indicado por Schnabel et al. no endereço eletrônico: <http://evolution.genetics.washington.edu/PBhtmls/NATO/DAChap.pdf>.

Wright (1978) sugeriu que o F_{ST} , índice de fixação alélica, pode ser interpretado qualitativamente em termos de diferenciação genética como segue: valores de 0 a 0,05 indicam baixa, 0,05 a 0,15 moderada, de 0,15 a 0,25 alta e acima de 0,25 diferenciação genética muito alta.

O cálculo do número de migrantes por geração (Nm), que representa o fluxo gênico entre as populações, foi realizado a partir do valor do F_{ST} por meio da fórmula $Nm = (1 - F_{ST}) / (4 F_{ST})$ (BLACK 1997). Valores de Nm superiores a 1 foram considerados como evidência de fluxo gênico (SLATKIN ; BARTON, 1989).

Para a análise da similaridade genética entre os indivíduos foi utilizado o programa computacional NTSYS-PC (ROHLF, 2002), por meio do coeficiente de Jaccard (J) e pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) que permite a construção do dendrograma de similaridade genética. O software BOOD (COELHO, 2000) foi utilizado para determinar a consistência de cada agrupamento através do método de reamostragem *Bootstrap* com 1000 repetições.

Para testar diferenças significativas das freqüências alélicas dos locos nos diferentes grupos de *P. lineatus* foi utilizado o teste G através do aplicativo computacional Popgen 1:31 (YEH; YANG; BOYLE, 1999). Para melhor visualização deste teste, foi realizado um cálculo de proporção, consistindo em dividir o número de locos de RAPD com diferenças significativas nas freqüências alélicas pelo número total de locos polimórficos.

ANEXO 4
Marcadores Microsatélites (SSR)

ANEXO 4 – Marcadores Microsatélites (SSR)

✓ Locos analisados

No presente trabalho foram analisados 3 locos de microsatélite para a espécie *P. lineatus*: *pl 1*, *64*, *102*. O loco *pl 1* foi isolado por Hatanaka; Henrique-Silva; Galleti (2002), sua amplitude alélica e a seqüência dos *primers* flanqueadores estão detalhadas na Tabela 6. Os locos *64* e *102* e a seqüência dos *primers* flanqueadores foram gentilmente cedidos por Guillermo Ortí (comunicação pessoal) para a utilização neste trabalho.

Tabela 6 – Seqüência dos pares de *primers* flanqueadores e amplitude alélica para o loco *pl 1*, segundo Hatanaka et al. (2002).

| | Seqüência dos pares de <i>primers</i> | Amplitude alélica (pb) |
|-------------------------|---|------------------------|
| Loco <i>pl 1</i> | F: TGACTGTGAACACGGTCACGC R: ACACAAGTAGAACATACCTCTG | 160 - 220 |

✓ Amplificação do DNA

As concentrações utilizadas de cada reagente nas reações de amplificação do DNA dos locos de microsatélite analisados estão detalhadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Componentes da reação de amplificação do DNA e concentrações utilizadas para os locos *pl 1*, *64* e *102* de microssatélite.

| Componentes da reação | Concentração estoque | Volume na reação (μL) | | | Concentração final | | |
|--------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------|------------|--------------------|-----------|------------|
| | | <i>pl 1</i> | <i>64</i> | <i>102</i> | <i>pl 1</i> | <i>64</i> | <i>102</i> |
| Água bidestilada | ----- | 4,2 | 7,25 | 4,25 | q.s.p | q.s.p. | q.s.p. |
| Tampão de reação | 10 x | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1x | 1x | 1x |
| dNTP | 2,5 mM | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| <i>Primer F</i> | 10 pmoles | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| <i>Primer R</i> | 10 pmoles | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| MgCl ₂ | 10 mM | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 2 | 2 | 2 |
| Enzima | 5 U/ μL | 0,2 | 0,15 | 0,15 | 1 | 0,75 | 0,75 |
| DNA | 1,25 ng/ μL | 4,0 | 1,0 | 4,0 | 5 | 1,25 | 1,25 |
| Volume total (μL) | --- | 15 | 15 | 15 | --- | --- | --- |

O processo de amplificação do DNA foi realizado em termociclador (PTC-100, MJ Research), os programas utilizados variaram conforme o loco estudado (Tabela 8).

Tabela 8 – Programas utilizados para amplificação de DNA de cada loco de microssatélite. Em destaque estão as temperaturas (T °) e tempos de duração de cada etapa assim como o número de ciclos utilizado para cada loco.

| Etapas | Loco <i>pl 1</i> | | Loco <i>64</i> | | Loco <i>102</i> | |
|-----------------------------|------------------|-------|----------------|-------|-----------------|-------|
| | T ° | Tempo | T ° | Tempo | T ° | Tempo |
| Desnaturação inicial | 94°C | 4' | 95°C | 3' | 94°C | 5' |
| Desnaturação | 94°C | 45'' | 94°C | 20'' | 94°C | 45'' |
| Pareamento | 58°C | 45'' | 58°C | 20'' | 51°C | 45'' |
| Extensão | 72°C | 45'' | 72°C | 20'' | 72°C | 20'' |
| Extensão final | 72°C | 5' | 72°C | 5' | 72°C | 5' |
| Número de ciclos | 35 | | 30 | | 35 | |

✓ Análise eletroforética

Após a amplificação do DNA das amostras, foi necessário fracionar os fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida desnaturante com concentrações de 8,5 % para o loco *102*; 9% para o loco *pl 1* e 9,5% para o loco *64*.

Para a obtenção dos géis, foi preparada uma solução desnaturante estoque contendo: 110 mL de solução Acri-Bis acrilamida 29:1, 192 g de Uréia, 40 mL de TEB 10X e água ultrapura até completar o volume final de 400 mL. Para o loco *pl 1*, o preparo do gel consistiu em 20 mL da solução desnaturante acrescidos de 26 µL de TEMED, 500 µL de persulfato de potássio (solução saturada) e 1mL de solução de poliacrilamida 40 %. Para o loco *64* e *102* foi utilizado o mesmo protocolo descrito acima modificando apenas o volume utilizado da solução poliacrilamida

40%, que foi de 1,5 mL para o loco 64 e de 0,5mL para o loco 102. A eletroforese foi realizada em cuba vertical e o tampão utilizado foi o TEB 1X diluído do TEB 10X.

Para a aplicação no gel, 5 μ L de cada uma das amostras de DNA amplificado foram previamente desnaturados em termociclador por 10 minutos a 95 °C na presença de 15 μ L de tampão de amostra para gel desnaturante (900 μ L de bromofenol 2,5%, 900 μ L de xilenocianol 2,5 %, 900 μ L de TEB 10X; 4,5 μ L de glicerol; 1,8 μ L de EDTA 0,5M pH 8,0; 3,6g de sacarose e 900 μ L de formamida 75%). Após a desnaturação, 10 μ L de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida.

Como marcador foi utilizada a amostra de *P. lineatus* número 463 (proveniente da escada de transposição de Canoas II) amplificada com o *primer pl 1* que apresentou um perfil bem definido de bandas. Durante a corrida eletroforética foram mantidos de 100 volts, na fonte, para os locos 64 e 102, e 110 volts para o loco *pl 1*. A corrida eletroforética se estendeu por aproximadamente 6:30 horas para o loco *pl 1* e 8 horas para os demais locos.

Logo após a corrida eletroforética o gel foi fixado por 10 min. em 100 mL de solução fixadora (150 mL de etanol, 10 mL de ácido acético e 840 mL de água destilada). Após os 10 min. foi adicionado a essa solução 1mL de solução de nitrato de prata (2g de AgNO₃ em 10 mL de água destilada) por mais 5 min. A solução fixadora foi descartada, e em seguida o gel foi levemente lavado em água corrente e submetido à 100 mL da solução reveladora de NaOH 40% até que a coloração do gel estivesse satisfatória. Descartada a solução reveladora, o gel foi então bem lavado em água corrente e fixado novamente, em solução fixadora por mais 15 min. Para otimização do processo de secagem do gel, este foi submetido a 100 mL de etanol absoluto por 3 min, para desidratação. Posteriormente, o gel foi

levemente submetido à água corrente para retomar sua coloração, em seguida embebido em solução de gelatina incolor comercial (1,5 g de gelatina incolor para 30 mL de água destilada) e envolto em duas camadas de papel celofane até sua secagem. Para evitar quebras no gel pela presença de dobras e bolhas, este foi mantido estendido através de um sistema de “bastidores” por aproximadamente 24 horas até sua secagem completa. Depois de secos, foram obtidas imagens dos géis através de Scanner (HP Scanjet 2400) as quais foram analisadas para identificação dos genótipos de cada espécime de *P. lineatus*, com relação aos locos estudados.

Com a finalidade de se obter dados comparativos entre as populações de *Prochilodus lineatus* das duas escadas de transposição nas análises dos locos de microssatélite foram utilizados 65 espécimes provenientes da escada de transposição de Canoas I e 74 de Canoas II.

✓ Análises Genéticas

A análise genética foi determinada por comparação dos perfis eletroforéticos do DNA amplificado para os locos *pl 1, 64 e 102* e identificação dos genótipos dos indivíduos analisados.

Com os dados obtidos nas análises eletroforéticas, foram calculados por meio do programa computacional Popgene 1:31 (YEH; YANG; BOYLE, 1999) os seguintes parâmetros de diversidade genética: heterozigose observada e esperada, freqüências alélicas, índice de fixação de Wright (1978) (estimativa de F_{IS} como medida de excesso ou falta de heterozigotos), teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (χ^2), identidade e distância genéticas de Nei (1978) e estimativa da divergência das freqüências gênicas entre as populações através das estatísticas F (WRIGHT,

1978). A escala proposta por Wright (1978) de classificação qualitativa da diferenciação genética também foi utilizada como parâmetro para as análises genéticas obtidas com o marcador microssatélite. A significância do F_{ST} obtido através do cálculo das estatísticas F e a estimativa do número de migrantes por geração (Nm) foram estimadas pelas mesmas fórmulas propostas por Black (1997) e utilizadas para o teste F_{ST} obtido por meio do marcador RAPD.

A diferenciação gênica, que leva em consideração a distribuição alélica entre as populações e a diferenciação genotípica que testa a distribuição dos genótipos nas diferentes populações foram estimadas para cada loco através da versão on-line do software GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

Conforme Castilho (in prep) a heterozigosidade observada (H_o) de um dado loco é a proporção de indivíduos heterozigotos observados nesse loco, já a heterozigosidade esperada (H_e) de um dado loco é calculada a partir das freqüências alélicas neste loco (NEI, 1978):

$$1 - \sum_{i=1}^k p_i^2, \text{ onde:}$$

p_i = a freqüência do alelo i em um total de k alelos para o loco considerado.

O valor de H_e dividido pelo conjunto de locos (n) corresponde à heterozigosidade esperada média:

$$\overline{H_e} = (1 - \sum_{l=1}^n \sum_{i=1}^k p_i^2) / n$$

Para o cálculo da estimativa da divergência das freqüências gênicas entre as populações foram considerados os três índices F de Wright (1951) que estão inter-relacionados da seguinte forma (cf. CASTILHO, in prep):

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) \text{ onde:}$$

F_{IT} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto de populações.

Mede a redução da heterozigosidade de um indivíduo relativamente ao total da população e reflete o efeito da consangüinidade e deriva genética;

F_{IS} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional. Mede a redução de heterozigosidade de um indivíduo devida à reprodução não casual dentro de uma subpopulação (consangüinidade), ou seja, a proporção da variância genética de uma subpopulação contida num indivíduo. Um valor elevado de F_{IS} implica um nível considerável de consangüinidade.

F_{ST} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia entre populações. Mede a redução de heterozigosidade devido à deriva genética dentro de subpopulações, refletindo a diferenciação genética entre subpopulações, ou seja, é a proporção de variância genética de uma subpopulação relativamente à variância genética total. Um valor de F_{ST} alto corresponde a uma diferenciação genética considerável entre populações.

A estrutura genética das populações de *P. lineatus* provenientes das escadas de transposição de Canoas I e Canoas II foi investigada através da análise de variância molecular (AMOVA - EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) implementada pelo programa ARLEQUIN 3.0 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).