



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO AMBROZIO GALINDO

**DIVERSIDADE DE PEIXES DO RIO LARANJINHA -
ALTO RIO PARANÁ**

Londrina
2014

BRUNO AMBROZIO GALINDO

**DIVERSIDADE DE PEIXES DO RIO LARANJINHA -
ALTO RIO PARANÁ**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia

Co-orientador: Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G158d Galindo, Bruno Ambrozio.
Diversidade de peixes do Rio Laranjinha – Alto Rio Paraná / Bruno Ambrozio Galindo.
– Londrina, 2014.
296 f. : il.

Orientador: Sílvia Helena Sofia.
Coorientador: Oscar Akio Shibata.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Ictiologia – Paraná, Rio, Bacia – Teses. 2. Peixe – Paraná, Rio – Teses. 3. Genética de populações – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. 5. Biodiversidade – Teses. I. Sofia, Sílvia Helena. II. Shibata, Oscar Akio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 597(816.2)

BRUNO AMBROZIO GALINDO

**DIVERSIDADE DE PEIXES DO RIO LARANJINHA - ALTO RIO
PARANÁ**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alberto José Prioli
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dr. Cláudio Henrique Zawadzki
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Fernanda Simões de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Mário Luis Orsi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de fevereiro de 2014

Dedico este trabalho à minha família,
em especial à minha esposa Teresa
Maria que me fortaleceu e inspirou à
cada etapa

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina que me proporcionou toda minha formação acadêmica, desde a graduação até o doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, por me proporcionar a realização deste trabalho, bem como ao departamento de Biologia Geral, professores por todo ensinamento e técnicos pelo competente trabalho.

À UENP, em especial ao Campus de Cornélio Procópio, por todo apoio logístico de infraestrutura e incentivos indispensáveis para realização deste trabalho.

À Fundação Araucária pela concessão da bolsa e apoio financeiro para realização deste trabalho.

Ao IBAMA e IAP pelas autorizações ambientais para realização das coletas.

Aos proprietários que nos permitiram utilizar suas terras para montagem da base de coleta durante as expedições.

À Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia, que me acolheu desde a graduação, soube me orientar e extrair o máximo que eu poderia render. Ao longo destes 14 anos de convivência foi muito mais do que minha tutora, foi amiga nos momentos difíceis e incentivadora frente aos desafios, muito mais do que genética me permitiu aprender com seu caráter e sua caridade.

Ao Prof. Dr. Oscar A. Shibatta, pela co-orientação nesta tese, pelos inúmeros ensinamentos sobre ictiologia, pela atenção e paciência em me atender dirimir minhas dúvidas. Pela grande colaboração na identificação dos exemplares e pelo grande exemplo de ictiólogo que sempre foi para mim.

À Profa. Dra. Fernanda S. de Almeida, sempre disposta a ajudar, agradeço por ter participado da banca de qualificação e por ter aceito fazer parte desta banca de defesa, pelas inúmeras ajudas em diversos momentos, e pelo grande exemplo de profissional e de pessoa.

Ao Prof. Dr. Mário Orsi, grande exemplo de biólogo, com certeza um dos grandes incentivadores deste trabalho e de um idealismo que permeia minha alma.

Ao Prof. Dr. Alberto Prioli, do qual sempre fui um admirador anônimo de seu trabalho desde os tempos de graduação, o qual muito me honrou aceitando o convite para esta banca.

Ao Prof. Cláudio H. Zawadzki, que me atendeu com toda solicitude possível durante um Simpósio em Ponta Grossa e desde então sempre disposto a nos ajudar a resolver inúmeros problemas, meu muito obrigado por aceitar participar desta banca.

Às professoras Ilce M. S. Colus e Ana Lúcia Dias, ex-coordenadora e atual coordenadora do PPGGBM e à secretária Sueli Miranda, pela paciência e atenção sempre dispensada com este aluno “à distância” do programa

Aos professores Claudete e Paulo Ruas, e colega desde a época de graduação Eduardo Ruas pelo incentivo e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Rogério F. de Souza, pela suplência nesta banca e por todos ensinamentos, incentivos e por sempre dividir seu conhecimento e experiência comigo.

Ao Prof. Dr. Luiz H. G. Pereira, pela suplência nesta banca e pelos ensinamentos práticos e teóricos.

À todos os colegas do LAGEA que sempre me trataram com muito carinho e atenção, mesmo quando um “estranho” por lá aparecia bagunçava tudo e sumia num piscar de olhos, muito obrigado: Lenice, Caconde, Douglas, Fernanda Midori, Alessandra.

À grande companheira Karen M. Suzuki, parceira desde os anos de graduação, sempre disposta a ajudar, ensinar, ouvir nossa.... muito obrigado Amiga.

À Profa. Dra. Cláudia B. R. Martinez, onde iniciei meus trabalhos com ictiologia, pelo incentivo, apoio e amizade de sempre.

Ao grande parceiro para todas as horas José Tavares, em meio a inúmeros problemas e inúmeras adversidades sempre soube me incentivar e acreditar, nunca abandonou o barco literalmente, muito obrigado ZECA, e vamos cair na água.

Àqueles que me fizeram acreditar que era possível realizar este trabalho, que permaneceram comigo até o fim, àqueles que um dia foram alunos, estagiários mas que hoje tenho enorme satisfação de tê-los como AMIGOS: Dhigo, Xandão, Wirso, Assis, Raul, Carlão, Gazal, Carol, Same, Mayara, Amanda. Com esse pessoal, eu ri, chorei, passei frio, senti saudade, nos alegamos muito.

Às meninas do GECON, minhas atuais estagiárias Moema, Mariana, Jéssica e Renata, estiveram comigo nesta reta final, que muito me ajudaram com reações, extrações, quantificações, procurando peixes, foram uns anjinhos nesta reta final, e principalmente souberam aguentar meu mal humor, nervosismo, crises de estresse sempre com muito carinho.

Ao grande amigo Dhiego, o cara que é grande responsável por este trabalho, passando finais de semana, férias, feriados, finais de ano inteiros comigo, carregou o piano quando eu precisei, me ensinou muito, muito mesmo, foi parceiro para todas as horas. Grande Dhigo, muito obrigado e a história continua....

Ao Amigo Willian M. Ohara, sempre generoso ao ensinar e compartilhar suas experiências, com quem pude aprender muito sobre ictiologia, coletas, fotografias dentre outras coisas, biólogo excepcional que foi fundamental na conclusão de parte deste trabalho.

À minha grande Amiga Fátima Aparecida da Cruz Padoan, que em todos os momentos me incentivou, soube compreender minha ausência, me defendeu quando preciso, acreditou em mim quando muitos não acreditavam, pessoa generosa que me permitiu participar e aprender muito ao lado dela, grande exemplo.

À todos os funcionários da UENP que em alguns momentos trabalharam a mais para suprir minha ausência, em especial aos amigos do setor de compras e almoxarifado: Elias e Tamara, à Dora sempre pensando e fazendo de tudo por mim, aos amigos do Gabinete: Ruth, Lúcia, Dani, Maritê, Néia, Adriana e todos estagiários que passaram por ali.

Aos meus colegas do Colegiado de Ciências Biológicas da UENP de Cornélio Procópio, por compreenderem minha ausência e me apoiarem em todos os projetos, em especial neste que se encerra, e pela parceria em TODOS os desafios que nos são propostos, obrigado pela parceria é um prazer lecionar e pesquisar ao lado de vocês, com vocês eu topo qualquer parada.

À todos os meus amigos e familiares que sempre souberam compreender minha ausência em diversos momentos e me apoiar incondicionalmente.

Aos meus compadres (Marcos, Carol, Otávio e Cris) pelos inúmero momentos agradáveis, pelo grande apoio, pela amizade que espero seja eterna, grandes presentes de Deus.

À minha família, Marina, Anderson, Nevi, DeVechi, Edna, Edson, Mindo, Virna, Dai e minhas queridas sobrinhas Gabriela e Júlia que encheram de alegria todos os momentos que passamos juntos, obrigado à todos pelo apoio, orações, palavras de incentivo, pelos inúmeros momentos agradáveis que me proporcionaram, vocês são a base de tudo.

À minha querida mãe, mulher inabalável, minha grande intercessora, incentivadora, pessoa que não mede esforços para me fazer feliz, muito obrigado por tudo, em ti toda essa história começou, agradeço à Deus todos os dias por tê-la em minha vida, obrigado por me acompanhar nesta etapa, vamos pra próxima agora.

Ao meu querido pai “*in memoriam*” meu grande exemplo de pai, profissional e de homem, meu eterno companheiro de viola e pescaria, como eu queria que você estivesse aqui, mas quem disse que não está! Está em tudo que nos deixou, principalmente nas grandes lembranças que o tempo não há de apagar.

À minha amada esposa, nossa, impossível imaginar este trabalho sem você, incrível como uma pessoa que não entende praticamente nada de ictiologia ou genética pôde ser tão essencial e fundamental para chegar até aqui, ela muitas vezes não precisava nem de palavras pra me ajudar, bastava um olhar, um gesto. Acreditou em mim quando às vezes nem eu acreditava, esteve firme ao meu lado, enxugou minhas lágrimas me amparou, e me ajudou a me levantar quando caí, soube compreender minha ausência melhor do que ninguém. Muito obrigado por tornar este caminho mais suave, e esta etapa mais bonita, e agora que venha a próxima.

E finalmente a Deus, que me escreveu cada um destes parágrafos acima antes mesmo de eu existir e tantos outros que não pude escrever, que iluminou meu caminho para que eu pudesse enxergar as pedras, me amparou e acolheu.

À todos, meu mais sincero MUITO OBRIGADO!

“[...] Hoje me sinto mais forte

Mais feliz, quem sabe

Só levo a certeza

De que muito pouco sei

Ou nada sei[...]

Tocando em frente

Almir Sater & Renato Teixeira (1991)

GALINDO, Bruno Ambrozio. **Diversidade de peixes do rio Laranjinha - Alto rio Paraná**. 2014. 296f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014

RESUMO

O rio Laranjinha é um importante curso d'água do estado do Paraná, apesar disto, sua ictiofauna ainda carece de estudos que poderiam servir como base na tomada de decisões à respeito de sua preservação, principalmente no contexto atual em que existe o interesse em se construir diversos empreendimentos hidrelétricos em seu curso. O levantamento da ictiofauna é o primeiro passo quando se deseja preservar a biodiversidade de um ecossistema. Os marcadores moleculares são muito utilizados na genética da conservação, dentre estes, os microssatélites e o marcador mitocondrial *D-loop* vêm se destacando em estudos populacionais. O presente trabalho buscou realizar um levantamento da biodiversidade de peixes do rio Laranjinha, considerando tanto o nível específico, como o nível molecular. Foram registradas 103 espécies, e destas, três tiveram sua diversidade genética analisada por meio de marcadores moleculares, *Brycon nattereri*, uma espécie ameaçada de extinção, que apesar de apresentar bons níveis de diversidade genética, mostrou evidências de um declínio populacional no passado; *Prochilodus lineatus*, um peixe migrador, que permitiu comprovar a existência de fluxo gênico entre os rios Paranapanema e Laranjinha; *Hypostomus ancistroides*, uma espécie não migradora, que revelou a divisão das populações desta espécie em dois grupos ao longo do rio Laranjinha: alto/médio e baixo Laranjinha. Fica evidente a importância deste rio pela presença de um grande número de espécies, que incluem, espécies ameaçadas de extinção e migradoras, também, por abrigar níveis satisfatórios de diversidade genética para as espécies estudadas. Assim, espera-se que estes aspectos da biodiversidade de peixes possam ser considerados em futuras decisões que envolvam a preservação deste rio.

Palavras-chave: Biodiversidade. Ictiofauna. Marcadores moleculares. Genética de populações.

GALINDO, Bruno Ambrozio. **Fish diversity from the Laranjinha River - Upper Paraná River**. 2014. 296p. Thesis (Ph.D. in Genetics and Molecular Biology) – State University of Londrina, Londrina. 2014

ABSTRACT

The Laranjinha River is an important watercourse in the state of Paraná. Nevertheless, its fish populations still lack studies that could provide a basis for making decisions regarding its preservation, especially in the current context, where there is interest in constructing several hydroelectric dams along its course. The inventory of fish populations is the first step for preserving biodiversity within an ecosystem. Molecular markers are widely used in conservation genetics. Among these, microsatellites and the mtDNA marker D-loop have been gaining prominence in population studies. The present study aims to conduct an inventory to determine the biodiversity of fish in the Laranjinha River, considering both the specific and the molecular level. Among the 103 species recorded, three had their genetic diversity analyzed using molecular markers: *Brycon nattereri*, a threatened species, which, despite showing good levels of genetic diversity, showed evidence of a demographic decline in the past; *Prochilodus lineatus*, a migratory fish, whose analysis confirmed the existence of gene flow between the Paranapanema and Laranjinha rivers; *Hypostomus ancistroides*, a sedentary species, which showed the division of populations of this species in two groups along the Laranjinha River: high/medium and lower river course. The importance of this river is evidenced by the presence of a large number of species, which include endangered and migratory fish, and because it harbors satisfactory levels of genetic diversity within the studied species. Thus, it is expected that such fish biodiversity aspects are considered in future decisions involving the preservation of this river.

Keywords: Biodiversity. Fish populations. Molecular markers. Population genetics.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Mapa parcial do sistema do Alto rio Paraná. Triângulos amarelos representam as usinas localizadas no rio Paranapanema: A: UHE Rosana, B: UHE Taquaruçu, C: UHE Capivara, D: UHE Canoas I, E: UHE Canoas II, F: UHE Salto Grande, G: UHE Ourinhos, H: UHE Chavantes, I: UHE Paranapanema, J: UHE Piraju, K: UHE Jurumirim. * UHE que possui escada de transposição para peixes.....26
- Figura 2** – Usina da Corredeira no rio Laranjinha (23°24'53.06"S / 50°27'8.60"O), a barragem possui aproximadamente 5m de altura. A seta amarela indica a escada de transposição inaugurada em 2006.28
- Figura 3** – Empreendimentos tramitando na ANEEL, atualizado em dezembro de 2012.28
- Figura 4** – Níveis hierárquicos da biodiversidade em ecossistemas aquáticos.30
- Figura 5** – Distribuição espécies / gêneros de vertebrados de água doce por regiões zoogeográficas. Números incluem estritamente peixes de água doce, anfíbios, mamíferos, reptéis e aves aquáticas. PA – Região Paleártica, NA – Região Neartica, NT – Região Neotropical, AT – Região Afrotropical, OL – Região Oriental, AU – Região Austrália, PAC – Região das Ilhas Oceânicas do Pacífico, ANT – Região Antártida.....32
- Figura 6** – As cinco maiores categorias de ameaças e seus impactos ou potenciais impactos interativos na biodiversidade de água doce.....33
- Figura 7** – Mapa das diferentes regiões biogeográficas ilustrando a diversidade de peixes de água doce no mundo. Os valores representam o número de espécies / gêneros por regiões zoogeográficas. PA – Região Paleártica, NA – Região Neartica, NT – Região Neotropical, AT – Região Afrotropical, OL – Região Oriental, AU – Região Austrália, PAC – Região das Ilhas Oceânicas do Pacífico, ANT – Região Antártida.....35
- Figura 8** – Localização dos principais estudos de diversidade íctia realizados no Alto rio Paraná. Seta vermelha aponta a bacia do rio das Cinzas, onde ainda não se apontava a existência de estudos de diversidade ictia. MS – Estado do Mato Grosso do Sul, GO – Estado de Goiás, MG – Estado de Minas Gerais, SP – Estado de São Paulo, PR – Estado do Paraná.....37

Figura 9 – Sistema do Alto rio Paraná (Vermelho) e bacias vizinhas do Paraguai e Baixo Paraná (Azul) Araguaia/Tocantis (Verde), São Francisco (Amarelo) e rios Costeiros (preto).....	39
Figura 10 – Visão subjetiva da alteração na importância relativa de diferentes marcadores moleculares aplicados ao estudo de peixes em todo o mundo?. O eixo horizontal indica o tempo, o eixo vertical corresponde ao uso total do marcador molecular, se mais de um marcador é utilizado em um determinado tempo sua importância relativa é refletida pela proporção no eixo vertical.	43
Figura 11 – Estrutura do genoma mitocondrial em <i>Petrochromis trewavasae</i> e <i>Tropheus moorii</i> . 13 genes codificantes de proteínas da cadeia respiratória (ND1, ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6 e CYTB), 22 genes de RNA transportador, 2 genes de RNA ribossômico (12S e 16S rRNA) e a região não codificante (D-loop)	45
Figura 12 – Localização e principais características dos grandes reservatórios mundiais e barragens com capacidade para acumulação de mais de 0.1km ³ . Esta versão possui 6.862 registros de reservatórios com uma capacidade acumulativa de 6.197km ³	60
Figura 13 – Nível de impactos por barragens. O mapa mostra os 292 sistemas dos maiores rios classificados em: não afetados, moderadamente afetados e fortemente afetado por barragens	61
Figura 14 – Potencial hidrelétrico, estimado para o ano de 2008, por bacia hidrográfica, em território brasileiro	63
Figura 15 – Potência instalada por estado em 2008.	64
Figura 16 – Esquema de como uma escada de transposição pode funcionar como uma armadilha ecológica. Nota-se à jusante da barragem uma maior riqueza de ambientes onde a espécie migradora poderia completar seu ciclo de vida. Largura das setas indicam a quantidade de fluxo de indivíduos.....	70

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Mapa dos pontos amostrados ao longo do rio Laranjinha. Círculos em vermelho representam os locais de coleta. Triângulo amarelo representa UHE Capivara e o triângulo verde representa UHE Canoas I, ambas no rio Paranapanema.....83
- Figura 2** – Vista parcial dos pontos de coleta ao longo do rio Laranjinha ilustrando os ambientes e a vegetação marginal. Pontos próximos a nascentes (a-c), pontos na porção média rio Laranjinha (d-f) e locais próximo a foz (g-i)84

CAPÍTULO 3

- Figura 1** – Exemplar de *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) coletado no rio Laranjinha. Número de registro 10548 – CP: 11,0 cm156
- Figura 2** – Mapa dos trechos de coleta no rio Laranjinha. Círculos vermelhos representam os trechos de coleta. Triângulo amarelo representa a UHE Capivara e o triângulo verde UHE Canoas I. Seta indica o rio Lageado Liso (amarelo), afluente do rio Tibagi, e afluentes do rio Laranjinha(laranja).....158
- Figura 3** – Rede de haplótipos encontrados para sete amostras (1 a 7) de populações de *H. ancistroides*, coletados ao longo do rio Laranjinha (bacia do Alto rio Paraná, sul do Brasil), gerada por meio do programa Network 4.6.1.1. As análises foram feitas com base no algoritmo median-joining. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Cores de preenchimento representam as amostras e as barras vermelhas representam as mutações entre os haplótipos172
- Figura 4** - Árvore de NJ com todos os 215 indivíduos + dois indivíduos “outgroup”. Números entre parênteses representam valores de bootstrap para análises de NJ/ MV / MP)174
- Figura 5** – Árvore de NJ com 17 haplótipos + dois indivíduos de “outgroup”. Números entre parênteses representam valores de bootstrap para análises de NJ/ MV / MP.....175
- Figura 6** - Teste de Mantel, correlações entre a divergência genética e a distância geográfica entre os diferentes pares de amostras de populações (P1 a P7) de *Hypostomus ancistroides* coletados em sete pontos no rio Laranjinha,

	com base nos marcadores de microssatélites. a) utilizando o estimador de divergência genética FST, b) utilizando o estimador de divergência genética RST.....	178
Figura 7 –	Representação gráfica dos agrupamentos bayesianos (K=2), gerados a partir de 12 locos de microssatélites para as sete amostras de <i>Hypostomus ancistroides</i> coletadas em sete localidades ao longo do rio Laranjinha, bacia do Alto rio Paraná.....	179
Figura 8 –	Dendrograma de similaridade, método de UPGMA, baseado na distância genética de Nei (1978) – representada na barra superior, mostrando os agrupamentos entre as sete amostras populações de <i>Hypostomus ancistroides</i> coletadas em sete diferentes pontos do rio Laranjinha (informações complementares sobre os pontos de coleta indicados ao lado de cada amostra na figura são apresentados na Tabela 1 e Figura 2). Valores dos nós representam a porcentagem de réplicas similares para <i>bootstrapping</i> com 1.000 permutações.....	181

CAPÍTULO 4

Figura 1 –	Área de estudo. Rio Laranjinha destacado em roxo, rio das Cinzas destacado em preto. Triângulos amarelos representam as usinas localizadas no rio Paranapanema: A: UHE Rosana, B: UHE Taquaruçu, C: UHE Capivara, D: UHE Canoas I, E: UHE Canoas II, F: UHE Salto Grande, G: UHE Ourinhos, H: UHE Chavantes, I: UHE Paranapanema, J: UHE Piraju, K: UHE Jurumirim. * UHE que possui escada de transposição para peixes	211
Figura 2-	Exemplar de <i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes 1837) capturado no rio Laranjinha. Comprimento Padrão: 23,4 cm, número de registro: 3143.....	217
Figura 3 –	Mapa dos pontos de coleta. Estrelas vermelhas representam locais de coleta. Triângulo amarelo representa UHE Capivara e triângulo verde a UHE Canoas I.....	219
Figura 4 –	Sítios variáveis entre os 24 haplótipos da região D-loop, encontrados para <i>P. lineatus</i> no rio Laranjinha e represa de Capivara, bacia do rio Paranapanema, Brasil.....	228

Figura 5 –	Rede de haplótipos da região D-loop para <i>P. lineatus</i> coletados no rio Laranjinha e represa de Capivara, baseada no algoritmo median-joining (BANDELT et al., 1999). Os círculos representam os haplótipos e são proporcionais às frequências dos mesmos, a cor amarela representa o rio Laranjinha e azul a represa de capivara. Os Números representam a localização dos pontos mutacionais na sequência	229
Figura 6 –	Representação gráfica dos agrupamentos bayesianos (K=3), gerados a partir de 11 locos de microsatélites para as amostras de <i>P. lineatus</i> coletadas no rio Laranjinha e na represa de Capivara.....	231

CAPÍTULO 5

Figura 1 –	Exemplar de <i>Brycon nattereri</i> coletado no rio Laranjinha (Ventania – PR)	254
Figura 2 –	Mapa do trecho de coleta de <i>Brycon nattereri</i> no rio Laranjinha a estrela vermelha indica o trecho de coleta no município de Ventania (PR).....	254
Figura 3 –	Procedimento de marcação (A, B e C), amostragem (D) para posterior soltura de exemplares de <i>Brycon nattereri</i>	255
Figura 4 –	Amplificação parcial da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) em exemplares de <i>Brycon nattereri</i> , de acordo com Panarari-Antunes et al. (2008), utilizando os <i>primers</i> L proposto por Cronin et al. (1993) e H descrito por Meyer et al. (1990)	262
Figura 5 –	a) rede de haplótipos de <i>Brycon nattereri</i> gerada por meio do programa Network 4.6.1.1, baseado no algoritmo <i>median-joining</i> , o tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo, números representam a posição da mutação na sequência; b) Gráfico com a proporção da distribuição dos haplótipos na população de <i>Brycon nattereri</i>	263

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Impactos potenciais dos reservatórios sobre a ictiofauna. 65

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Descrição dos locais amostrados no rio Laranjinha, afluente rio Paranapanema, Paraná. 82

Tabela 2 - Lista de espécies capturadas ao longo do rio Laranjinha (locais A a I, ver Figuras 1 e 2, e Tabela 1 para a localização e caracterização), Paraná, Brasil e suas respectivas abundância de captura. □ espécie não nativa de acordo com Graça & Pavanelli (2007), Langeani et al. (2007), Júlio Jr et al. (2009) e Orsi comunicação pessoal. ♦ espécie adicionais registrada na bacia por Costa *et al.* (2013).. 85

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Description of 13 polymorphic microsatellite loci isolated from Neotropical armored catfish *Hypostomus ancistroides*. Ta = optimal annealing temperatures, k = number of alleles, allele size range (bp), HO = observed heterozygosity, HE = expected heterozygosity estimated from 30 individuals, Q = paternity exclusion probability, I = probability of genetic identity, FIS = endogamy coefficient, PIC = polymorphic information content, GenBank accession numbers. *Significant Hardy-Weinberg Equilibrium deviation ($P < 0.05$)..... 148

Tabela 2 - Cross-amplification of the 13 polymorphic loci in 13 species of Loricariidae and one species of Callichthyidae. N = sample size. The number in brackets represents the number of alleles. 149

CAPÍTULO 3

- Tabela 1** – Trechos de coleta distribuídos ao longo do rio Laranjinha, sendo Ventania o trecho mais próximo à nascente e Foz o trecho mais próximo à foz. N = número de indivíduos utilizados nas análises genéticas por trecho de coleta, Cód = código do trecho amostral. 159
- Tabela 2** – Parâmetros genéticos estimados para as sete amostras (P1 a P7) de populações de *Hypostomus ancistroides* do rio Laranjinha, no sul do Brasil, analisadas por meio dos marcadores de microssatélites. N – número de indivíduos analisados; Na – número de alelos; Ne – número de alelos efetivos; Np – número de alelos privados; Naf >5% - número de alelos com frequência acima de 5%; RA – riqueza alélica; Ho – heterozigozidade observada; He – heterozigozidade esperada; FIS – índice de endogamia (*P < 0,05), EHW – teste de significância para possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor de P < 0,05 após a correção sequencial de Bonferroni considerando $\alpha = 0,05$). 166
- Tabela 3** – Parâmetros de diversidade genética de *Hypostomus ancistroides* coletados no rio Laranjinha, no sul do Brasil, para os marcadores de microssatélites e mitocondriais (D-loop). Considerando os sete trechos do rio onde as amostras das populações (P1 a P7) foram coletadas. N – número de indivíduos analisados, \bar{P} – proporção de locos polimórficos, A – número total de alelos encontrados na amostra, Np – número de alelos privados, $\bar{N}A$ – número médio de alelos por loco na amostra, $\bar{N}e$ - número médio de alelos efetivos por locos na amostra, HO – heterozigozidade observada média na amostra, He – Heterozigozidade esperada média na amostra, Hs – Heterozigozidade esperada de Nei (1973), FIS – Índice de endogâmia dentro da população, Nh – número de haplótipos encontrados, h – diversidade haplotípica, π – diversidade nucleotídica, D - teste de neutralidade de Tajima (1989), Fs – teste de neutralidade de Fu (1997). *P < 0,05..... 168
- Tabela 4** – Teste de sinal para excesso de heterozigosidade para os 12 locos de microssatélites nas sete populações de *Hypostomus ancistroides* estudadas no rio Laranjinha. IAM – Modelo de Alelos Infinitos

	(<i>Infinite Allele Model</i>), TPM – Modelo Bifásico (90% SMM) (<i>Two Phase Model</i>), SMM – Modelo Passo a Passo (<i>Stepwise Mutation Model</i>). *P≤0,05 indicando excesso de heterozigosidade.	169
Tabela 5 -	Sítios variáveis entre haplótipos da região D-loop encontrados entre 215 amostras de <i>Hypostomus ancistroides</i> provenientes de sete localidades do rio Laranjinha, o qual pertence à bacia do Alto rio Paraná, Brasil.	171
Tabela 6 –	AMOVA (Análise da Variância Molecular) para as amostras de <i>Hypostomus ancistroides</i> coletados ao longo do rio Laranjinha, para os marcadores microsstélites e D-loop. *P≤001 (teste de significância com 1023 permutações)	176
Tabela 7 –	Diferenciação genética entre os pares de populações (P1 a P7) de <i>Hypostomus ancistroides</i> do rio Laranjinha estimada a partir dos marcadores microssatélites e D-loop. Φ ST, FST e RST – parâmetros que usam como base as estatísticas F de Wright. DNei - distância genética de Nei (1978). Também são indicadas as distâncias geográficas entre os locais onde as sete amostras foram coletadas. *P<0,05 (teste de significância com 1023 permutações).....	177
Tabela 8 –	Inferência de fluxo gênico obtida por análise bayesiana utilizando o programa BeysAss. Porcentagem de migrantes e de não migrantes dentro de cada uma das sete amostras estudadas (Pop 1 a Pop 7). Entre parênteses intervalo de confiança (IC).....	180
Tabela 9 -	Relação das diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) com eventos demográficos históricos. Extraída de Grant e Bowen (1998).....	187

CAPÍTULO 4

Tabela 1 –	Localização dos trechos de coleta no rio Laranjinha e represa de Capivara.	218
Tabela 2 –	Condições utilizadas na reação de PCR dos marcadores microssatélites, modificado segundo protocolo para marcação dos produtos de PCR de Schulelke (2000). Utilizando o Kit comercial Go Taq® Green Master Mix (Promega, Wisconsin, USA).	220

Tabela 3 -	Condições utilizadas na reação de PCR da região D-loop do genoma mitocondrial, utilizando o Kit comercial Go Taq® Green Master Mix (Promega).....	222
Tabela 4 –	Parâmetros genéticos estimados para as amostras de <i>Prochilodus lineatus</i> do rio Laranjinha e represa de Capivara, bacia do Paranapanema, Brasil, analisadas por meio dos marcadores de microsatélites. N – número de indivíduos, Na – número de alelos, Ne – número de alelos efetivos, Np – número de alelos privados, Naf >5% - número de alelos com frequência acima de 5%, RA – riqueza alélica, Ho – heteroziguidade observada, He– heteroziguidade esperada, FIS – índice de endogamia (*P < 0,05), EHW – teste de significância para possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor de P < 0,05 após a correção sequencial de Bonferroni considerando $\alpha= 0,05$). ANul – presença de alelos nulos.....	225
Tabela 5 –	Parâmetros de diversidade genética para <i>P. lineatus</i> coletados no rio Laranjinha e represa de Capivara, estimados por meio dos marcadores microsatélite e D-loop, considerando a amostra total. N – número de indivíduos analisados, \bar{P} – Proporção de locos polimórficos, A – número total de alelos encontrados na amostra, Np – número de alelos privados, $\bar{N}A$ – número médio de alelos por locos na amostra, $\bar{N}E$ - número médio de alelos efetivos por locos na amostra, HO – Heteroziguidade observada média na amostra, He – Heteroziguidade esperada média na amostra, Hs – Heteroziguidade esperada de Nei (1973), FIS – Índice de endogâmia dentro da população (*P < 0,05), RA – Riqueza Alélica, Nh – número de haplótipos encontrados, Nhe – número de haplótipos exclusivos, h – Diversidade haplotípica, π – Diversidade nucleotídica, D - teste de neutralidade de Tajima (1989), Fs – teste de neutralidade de Fu (1997). NS – Não Significativo	226
Tabela 6 -	Teste de sinal para excesso de heteroziguidade para os 11 locos de microsatélites duas amostras de <i>P. lineatus</i> . IAM – Modelo de Alelos Infinitos (<i>Infinite Allele Model</i>), TPM – Modelo Bifásico (90% SMM) (<i>Two Phase Model</i>), SMM – Modelo Passo a Passo (<i>Stepwise Mutation Model</i>). *P≤0,05 indicando excesso de heteroziguidade.....	227

Tabela 7 –	Frequência absoluta de haplótipos da região D-loop encontrados em <i>P. lineatus</i> coletados no rio Laranjinha e na represa de Capivara.....	228
Tabela 8 -	AMOVA (Análise da Variância Molecular) para as amostras de <i>P. lineatus</i> coletados no rio Laranjinha e represa de Capivara, para os marcadores microsstélites e mitocondriais (<i>D-loop</i>). * $P \leq 0,01$ (teste de significância com 1023 permutações).....	230
Tabela 9 –	Inferência de fluxo gênico bayesiana utilizando o programa BeysAss. Porcentagem de migrantes e de não migrantes dentro de cada uma das duas localidades estudadas (rio Laranjinha e represa de Capivara) para a espécie <i>P. lineatus</i> . Entre parênteses intervalo de confiança (IC).....	231

CAPÍTULO 5

Tabela 1 -	Amplificação heteróloga de seis <i>primers em Brycon nattereri</i> . Temperatura de pareamento (Ta), número de alelos (NA), amplitude de peso dos alelos em pares de bases (pb), motivo proposto pelo autor que caracterizou o loco. Locus com a sigla BoM foram originalmente descritos para <i>Brycon opalinus</i> por Barroso et al. (2003); Bh foram descritos para <i>Brycon hilarii</i> por Sanches e Galetti (2006); Bc originalmente descrito para <i>Brycon cephalus</i> por Matsumoto e Hilsdorf (2009).....	261
Tabela 2 -	Resultados de análises da diversidade genética em seis <i>loci</i> de microssatélite de uma população remanescente de <i>Brycon nattereri</i> encontrada no rio Laranjinha. Número de alelos (Na), número de alelos efetivos (Ne), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), coeficiente de endogamia (Fis), P-valor para desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), heterozigosidade esperada de Nei (Hs), índice de Shannon (I). NS = não significativo. SD = desvio padrão.	261
Tabela 3 -	Sítios variáveis de DNA mitocondrial entre quatro haplótipos da região controle do DNA mitocondrial (<i>D-loop</i>) amostrados de 40 indivíduos de <i>Brycon nattereri</i> . Número de cada haplótipo na amostra (N).....	263

Tabela 4 - Parâmetros de diversidade genética dentro do gênero *Brycon*. NPOP = tamanho da amostra, S = amostra selvagem, C = amostra de cativo, NS = não significativo, NA = não avaliado, He = heterozigosidade esperada, Ho= heterozigosidade observada, EHW = Desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, FIS POP = Coeficiente de endogamia da população, Bottleneck = possibilidade da ocorrência de Bottleneck recente à partir de dados de microssatélite. 267

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1	Histórico de Barramentos nos rio Paranapanema	24
2.2	Rio Laranjinha.....	25
2.3	Biodiversidade	29
2.4	Diversidade de Peixes no Mundo, no Brasil e no Alto Rio Paraná.....	35
2.5	Diversidade Peixes Bacia do Cinzas	38
2.6	Genética da Conservação e Marcadores Moleculares	40
2.7	Análise da diversidade e estrutura genética em peixes na bacia do rio Paranapanema	55
2.8	Barramentos e Impactos	59
3	OBJETIVOS	76
3.1	Objetivos Gerais.....	76
3.2	Objetivos Específicos.....	76
4	TRABALHOS	77
4.1 Capítulo 1 -	PEIXES DO RIO LARANJINHA, BACIA DO ALTO RIO PARANÁ, PARANÁ, BRASIL	77
ANEXO I –	Catálogo fotográfico dos peixes do rio Laranjinha	96
4.2 Capítulo 2 -	ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF 13 POLIMORFIC MICROSATELLITE LOCI IN <i>hypostomus</i> <i>ancistroides</i> (TELEOSTEI, LORICARIIDAE) AND CROSS- AMPLIFICATION IN RELATED SPECIES.	132
4.3 Capítulo 3 -	ESTRUTURA GENÉTICA <i>Hypostomus ancistroides</i> , (SILURIFORMES, LORICARIIDAE), EM UM RIO NEOTROPICAL AMEAÇADO PELA IMPLANTAÇÃO DE PEQUENAS CENTRAIS HIDRELÉTRICAS (PCHs).....	150

4.4 Capítulo 4 -	IMPORTÂNCIA DE UM TRIBUTÁRIO NA MANUTENÇÃO DOS ESTOQUES DE PEIXES MIGRADORES EM UM SISTEMA COM BARRAMENTOS EM CASCATA	208
4.5 Capítulo 5 -	DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE <i>Brycon nattereri günther</i> , 1864 (OSTEICHTHYES; CHARACIDAE) UMA ESPÉCIE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO	248
5	CONCLUSÕES GERAIS	282
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	283

1 INTRODUÇÃO

O rio Laranjinha compõe uma importante bacia hidrográfica do norte do Estado do Paraná, com aproximadamente 350 km de extensão, sendo o principal afluente do rio das Cinzas, o qual, que por sua vez, deságua na represa de Capivara, formada pelo rio Paranapanema. A importância da bacia do rio das Cinzas vem sendo inferida por diversos autores que a apontam como uma possível rota migratória de diversas espécies de peixes, e como tal, fundamental para a manutenção das populações de diversas espécies de peixes do médio Paranapanema (DIAS et al., 2004; HOFFMANN, ORSI e SHIBATTA, 2005; PAULA, 2006; LOPES et al., 2007; VIANNA e NOGUEIRA, 2008; ORSI, 2010). O rio Laranjinha possui apenas um pequeno barramento, a aproximadamente 100 km de sua foz, construído na metade do século passado, e em 2006 foi construída uma escada de transposição para peixes neste local (SCHWARTZ, 2006). Desta forma, apesar deste pequeno barramento, o rio Laranjinha na maior parte de seu percurso mantém características lóticis. No entanto, este cenário pode mudar drasticamente nos próximos anos, pois tramitam atualmente na Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) diversos projetos que objetivam a implantação de PCHs (Pequena Central Hidrelétrica) na bacia do rio das Cinzas, inclusive no rio Laranjinha (ANEEL, 2013)

É um senso comum que a construção de barramentos nos rios e o controle das cheias estão entre os principais fatores que promovem a perda de diversidade em ecossistemas aquáticos continentais (VRIJENHOEK, 1998; DUDGEON et al., 2006; LÉVÊQUE et al., 2008; GEIST, 2011) este cenário pode ser igualmente considerado para o Brasil (AGOSTINHO, THOMAZ e GOMES, 2005).

O termo biodiversidade refere-se às diferentes formas de vida existentes, ou seja, as diversas espécies, as populações de cada espécie e a diversidade genética dentro e entre estas populações (FREELAND, 2005; FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010). A diversidade genética, que constitui a base da biodiversidade, pode ser interpretada como a variação genética dentro das espécies ou, de uma maneira mais abrangente como a variação genética dentro de ecossistemas inteiros (GEIST, 2011)

O primeiro passo para se conservar a biodiversidade de uma área é a realização de um inventário para conhecermos as espécies que habitam uma determinada área

(SIMIC et al., 2007). Em seguida, para acessar a biodiversidade das espécies em nível molecular, os estudos em genética da conservação fazem uso de marcadores moleculares, que são ferramentas extremamente úteis para o desenvolvimento de planos de manejo mais adequados para populações naturais de peixes neotropicais (PIORSKI, 2008).

Estudiosos de ecossistemas de água doce reconhecem que modificações brutas em habitats de água doce constituem ameaças à biodiversidade, entretanto as evidências empíricas são insuficientes para convencer alguns legisladores. Nós necessitamos de estudos provando o óbvio, como por exemplo, que uma população de uma espécie de peixe migrador será afetada se conexões laterais ou longitudinais forem cortadas (ABELL, 2002).

Os marcadores microssatélites são repetições em *tandem* de pequenas sequências de 1 a 6 bases (OLIVEIRA et al., 2006), codominantes e de herança mendeliana, amplamente dispersos pelos cromossomos, (DeWOODY e AVISE, 2000) com elevadas taxas de mutação (YUE, DAVID e ORBAN, 2007). Outros marcadores, com características bem diferentes, são aqueles presentes no DNA mitocondrial, estes têm se tornado muito populares devido à ausência de recombinação, herança matrilineal, altas taxas de mutação, pequeno tamanho efetivo populacional e pela disponibilidade de *primers* universais (FREELAND, 2005). O uso conjunto destas técnicas além de diagnosticar os níveis atuais da diversidade genética, podem elucidar os eventos evolutivos que a moldaram até o estado presente.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo realizar um levantamento da diversidade de peixes, e no caso de algumas espécies, analisar a diversidade até o nível molecular, na tentativa de compreender a distribuição desta diversidade genética ao longo do rio. Paralelamente, foi montado um banco de tecidos para todas as espécies coletadas no rio, o que garante um registro histórico do momento atual da diversidade de peixes do rio Laranjinha, desde o nível de espécies até o nível molecular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico de barramentos no rio Paranapanema

O rio Paranapanema é um dos principais afluentes da margem esquerda do rio Paraná (Figura 1), possuindo em sua calha principal 11 usinas hidrelétricas (UHE), no sentido de sua foz para sua nascente são elas: UHE Rosana (1986), UHE Taquaruçu (1989), UHE Capivara (1978), UHE Canoas I (1999), UHE Canoas II (1999), UHE Salto Grande (1958), UHE Ourinhos (2005), UHE Chavantes (1971), UHE Paranapanema (1932), UHE Piraju (2002), UHE Jurumirim (1962). Estas usinas juntas possuem uma capacidade de geração de 2.386.756 kW, o que representa aproximadamente 2,8% da hidroeletricidade gerada em todo Brasil (BIG, 2013). O rio Paranapanema, assim como a maioria dos tributários do rio Paraná (Grande, Paranaíba, Tietê e Iguaçu), foi transformado em uma sucessão de lagos artificiais (LOPES et al., 2007; PETRERE JR, 1996). Neste sistema apenas cinco barragens possuem escadas de transposição para peixes, as barragens de Canoas I e II, Ourinhos, Paranapanema e Piraju (LOPES et al., 2007; ARCIFA, ESGUÍCERO, 2012; COMPANHIA BRASILEIRA DE ALUMÍNIO, 2013; SANTA CRUZ GERAÇÃO DE ENERGIA, 2013).

O reservatório de Capivara localiza-se entre os reservatórios de Taquaruçu e Canoas I, respectivamente à sua jusante e montante. Anteriormente à implantação do complexo UHE Canoas I e II em 1999, havia um grande trecho de rio livre de barramento, aproximadamente 200 km, que preservava características lóticis, com o término da construção do complexo Canoas os únicos trechos lóticis da represa de Capivara restringiam-se aos seus principais tributários os rios das Cinzas e Tibagi (VIANNA e NOGUEIRA, 2008). Ao contrário do que ocorre na represa de Capivara, no trecho compreendido entre a UHE de Canoas I e a UHE de Salto Grande não existe nenhum grande tributário, portanto, os peixes adultos que ascendem as escadas de Canoas I e II podem ter grandes dificuldades em se reproduzir, ainda, precisamos considerar a ocorrência de pesca predatória ilegal e em grande intensidade à jusante da barragem de Salto Grande (LOPES et al., 2007; RAMOS et al., 2012).

2.2 Rio Laranjinha

O rio Laranjinha tem sua nascente localizada no município de Ventania (PR) ($24^{\circ}15'8,55''S$ / $50^{\circ}12'1,35''O$), a aproximadamente 1000 m acima do nível do mar, e sua foz ($23^{\circ}1'53,90''S$ / $50^{\circ}26'51,90''O$) na divisa entre os municípios de Bandeirantes e Santa Mariana, também no estado do Paraná a aproximadamente 346 m do nível do mar. Com uma extensão de aproximadamente 350 km em suas sinuâncias, constitui o principal afluente do rio das Cinzas, o qual, por sua vez, deságua na represa de Capivara localizada no rio Paranapanema (Figura 1). O rio Laranjinha está localizado na Bacia Sedimentar do Paraná, sua nascente e foz localizam-se, respectivamente, no Segundo e Terceiro planaltos paranaenses (SANTOS et al., 2006).

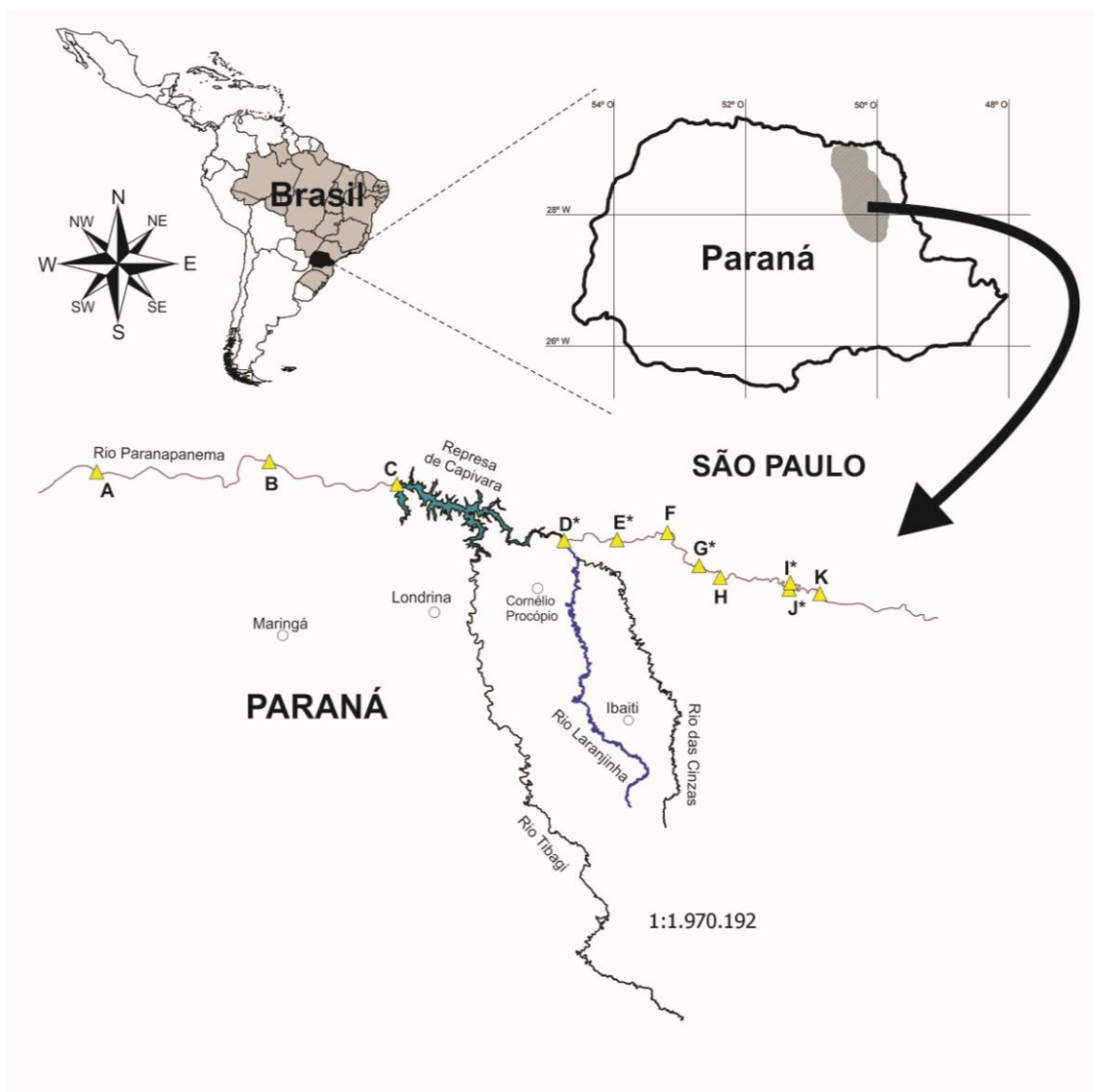


Figura 1 – Mapa parcial do sistema do Alto rio Paraná. Triângulos amarelos representam as usinas localizadas no rio Paranapanema: A: UHE Rosana, B: UHE Taquaruçu, C: UHE Capivara, D: UHE Canoas I, E: UHE Canoas II, F: UHE Salto Grande, G: UHE Ourinhos, H: UHE Chavantes, I: UHE Paranapanema, J: UHE Piraju, K: UHE Jurumirim. * UHE que possui escada de transposição para peixes. (FONTE: do autor).

Apesar de sua importância, a bacia do rio Laranjinha nunca teve sua diversidade de peixes inventariada por completo. Vianna e Nogueira (2008) coletaram em um único trecho do rio Laranjinha durante um trabalho sobre o ictioplâncton e fatores limnológicos do rio das Cinzas. Adicionalmente, dois tributários do rio Laranjinha também já foram inventariados, o ribeirão do Penacho (COSTA et al., 2013a) e o ribeirão Água das Araras (COSTA et al., 2013b).

O rio das Cinzas, segundo Vianna e Nogueira (2008), vem sofrendo algumas perturbações que, conseqüentemente, afetam a qualidade de sua água, tais como, uso irregular do solo, atividades agrícolas, simplificação de suas matas ripárias, lançamentos de efluentes industriais, extração de areia entre outras. Ainda, segundo estes autores, devido à similaridade limnológica entre o rio das Cinzas e o baixo rio Laranjinha, é possível que o rio Laranjinha venha sofrendo impactos da mesma natureza.

Apesar disto, fortes evidências já apontam o rio Laranjinha como um corpo d'água de grande importância para a região, por exemplo, Vianna e Nogueira (2008) coletaram larvas de Siluriformes e Characiformes, e capturaram peixes com gônadas maduras na foz do rio Laranjinha, o que são fortes evidências de sua importância para a reprodução de peixes do baixo Paranapanema, papel este que já havia sido destacado anteriormente por diversos autores (DIAS et al., 2004; HOFFMANN, ORSI e SHIBATTA, 2005; PAULA, 2006; LOPES et al., 2007; VIANNA e NOGUEIRA, 2008; ORSI, 2010).

O rio Laranjinha possui apenas uma PCH (Pequena Central Hidrelétrica) chamada "Usina da Corredeira" em sua porção média (23°24'53,06"S / 50°27'8,60"O), este barramento foi construído entre 1956 e 1960. Entretanto, devido à problemas técnicos, a referida usina jamais entrou em operação. Quase meio século após o início da sua construção foi implantada em 2006 uma escada de transposição de peixes junto a esta PCH (Figura 2) (SCHWARTZ, 2006). Outro fato a ser destacado é existência de diversos projetos em trâmite na ANEEL objetivando a implantação de 10 PCHs na bacia do rio das Cinzas, sendo seis no rio Laranjinha e quatro no rio das Cinzas (ANEEL, 2013) (Figura 3).



Figura 2 – Usina da Corredeira no rio Laranjinha ($23^{\circ}24'53.06''S$ / $50^{\circ}27'8.60''O$), a barragem possui aproximadamente 5m de altura. A seta amarela indica a escada de transposição inaugurada em 2006. (FOTOS: do autor).



PCH'S

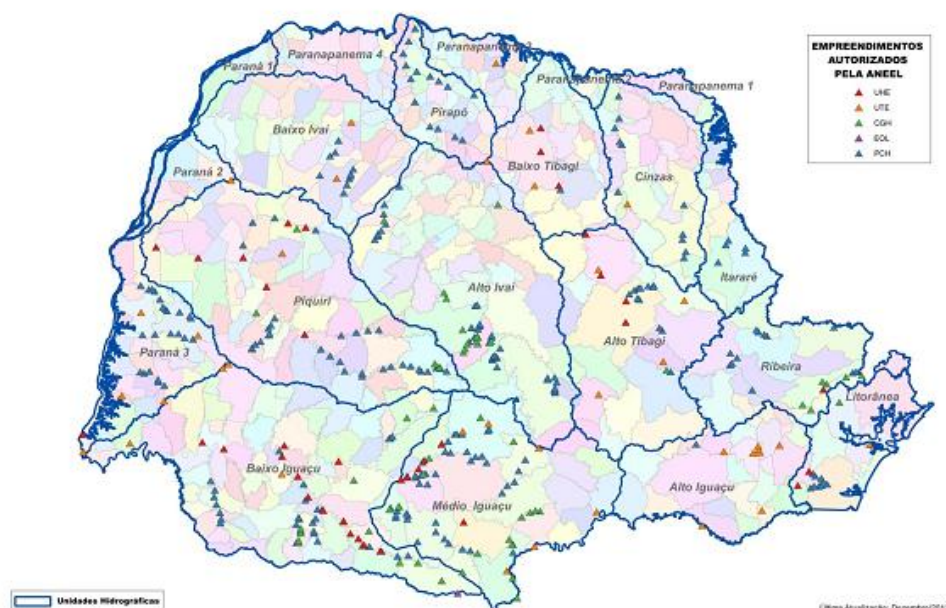


Figura 3 – Empreendimentos tramitando na ANEEL, atualizado em dezembro de 2012. (FONTE: IAP – Instituto Ambiental do Paraná).

2.3 Biodiversidade

A expressão diversidade biológica sempre trouxe a ideia do conjunto da variabilidade ecológica, mensurada pelo número de espécies de uma comunidade e suas interações, e diversidade genética, fundamentalmente a diversidade de alelos no vários locos de uma espécie (SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012)

O termo biodiversidade refere-se às diferentes formas de vida que habitam nosso planeta, incluindo número de espécies e suas populações, diversidade genética dentro e entre estas populações (FREELAND, 2005; FRANKHAM, BALLOU, BRISCOE, 2010).

Compreendendo a verdadeira extensão do termo biodiversidade, fica mais evidente a atual “Crise da Biodiversidade” que atravessamos. As atividades humanas têm provocado direta ou indiretamente uma redução muito rápida da biodiversidade; a dimensão do problema é tão grande que já é chamada da “Sexta Extinção”, pois a magnitude alcançada é comparável as outras cinco extinções em massa que nosso planeta já passou, registrada por meio do registro fossilífero (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010)

O primeiro passo para se conservar a biodiversidade de uma área é a realização de um **inventário** para conhecermos as espécies que habitam uma determinada área. Em seguida, deve-se avaliar e classificar as espécies segundo seu nível de ameaça, baseando-se nos critérios do IUCN (World Conservation Union) e de órgãos regulamentadores locais. O simples fato de algumas espécies constarem em alguma destas listas representa uma ameaça de extinção global ou local, e que a área em questão necessita de medidas apropriadas para sua conservação (SIMIC et al., 2007).

Segundo Abell (2002), as pesquisas básicas, onde certamente se enquadram os inventários, são de fundamental importância, pois ainda que não possam impedir a construção de novos empreendimentos sua informações auxiliam na avaliação dos seus efeitos e podem influenciar decisões futuras.

A falta de conhecimento sobre a biodiversidade de ecossistemas de água doce em regiões tropicais limita tanto as tentativas de se quantificar a crise da biodiversidade destes ambientes, como, a capacidade de resolvê-la. O conhecimento desta biodiversidade é fundamental, pois a documentação dos declínios e extinções, bem

como o entendimento de suas causas são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação da biodiversidade (DUDGEON et al. 2006).

Geist (2011) ressalta que há um senso comum no qual a riqueza de espécies é tomada como principal medida de biodiversidade, porém o autor propõe um conceito mais sofisticado de biodiversidade que expande a definição desta além do nível de espécies e abrange uma gama maior de diversidades, incluindo desde ecossistemas inteiros, habitats e ecótonos, suas comunidades biológicas e espécies até a variação dentro das espécies no nível fenotípico e genético. A diversidade genética, que constitui a base da biodiversidade, pode ser interpretada como a variação genética dentro das espécies ou, de uma maneira mais abrangente como a variação genética dentro de ecossistemas inteiros (Figura 4).

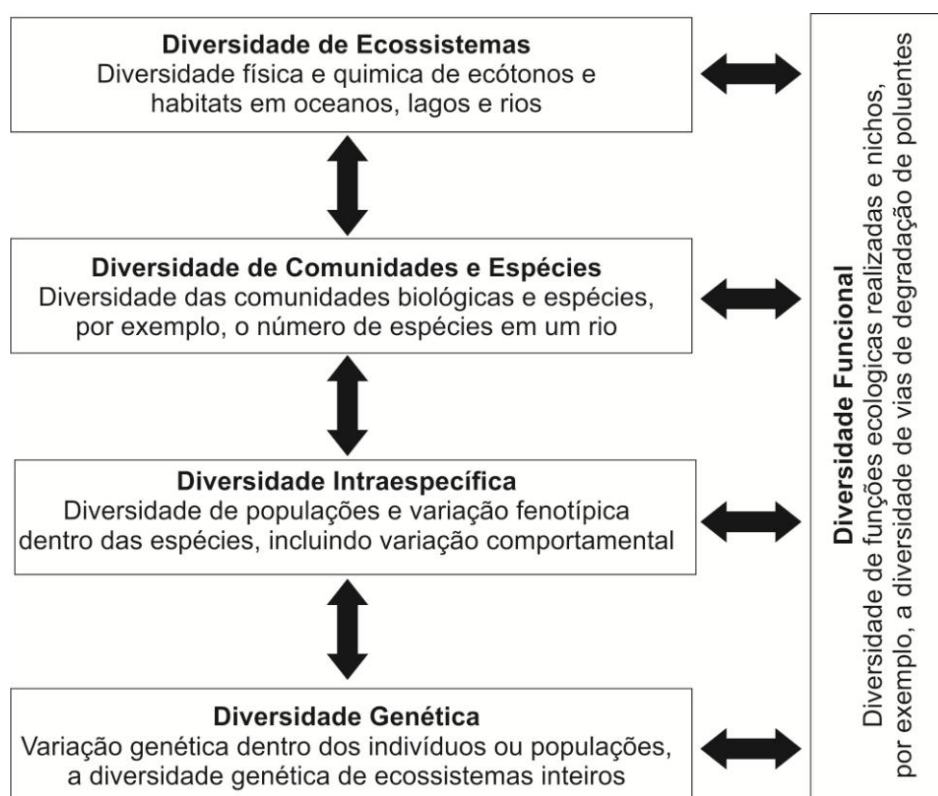


Figura 4 – Níveis hierárquicos da biodiversidade em ecossistemas aquáticos. (Modificado de GEIST, 2011).

Atualmente a conservação da biodiversidade é um tema popular. Com o aumento incontrolado da população humana, habitats de diversos grupos de animais estão sendo destruídos, levando ao declínio populacional e eventual extinção de suas populações. Por meio do manejo de populações o endocruzamento pode ser prevenido

através da manutenção dos tamanhos populacionais acima de um nível crítico, com regular observação dos níveis de heterozigosidade e com acasalamentos que maximizem a variabilidade genética e minimizem os endocruzamentos (BARROSO et al., 2005).

Conflitos entre a necessidade de desenvolvimento econômico e a conservação ambiental estão entre as principais agendas em muitos países no hemisfério sul. Peixes são ainda um importante recurso econômico para muitas comunidades locais e a conservação dos recursos genéticos dos peixes de água doce é fundamental em qualquer plano de desenvolvimento. Para atingir estes objetivos, esforços precisam ser feitos para gerar dados mais precisos sobre a estrutura genética populacional que pode ser aplicada em qualquer estratégia de conservação biológica (OLIVEIRA, FORESTI e HILSDORF, 2009).

Informações sobre a biodiversidade de espécies e habitats são apontadas por Abell (2002) como critérios para se elencar locais que devem ser prioridades para a conservação de ambientes de água doce.

Os ecossistemas de água doce são apontados como detentores de grande diversidade representando uma grande porcentagem de animais, plantas e microrganismos, entretanto, uma boa parte desta biodiversidade permanece ainda subestimada e/ou desconhecida (AGOSTINHO, THOMAZ e GOMES, 2005; DUDGEON et al., 2006; BALIAN et al., 2008). Apesar de que em vertebrados a diversidade e distribuição são melhores conhecidas do que em outros grupos, ainda são descobertas novas espécies regularmente (BALIAN et al., 2008)

Apesar de haver um consenso de que a biodiversidade documentada está subestimando a realidade, um levantamento global de animais de água doce apontou a existência de aproximadamente 126.000 espécies, o que representa 9,5% do número total de espécies reconhecidas globalmente. No entanto, como estes ambientes representam apenas 0,01% da superfície total do planeta fica evidente que uma fração desproporcional da biodiversidade global habita nestes ecossistemas. Deste montante 14,5% são vertebrados. A região Neotropical é onde o grupo dos vertebrados é mais diverso com aproximadamente um terço (6.041 espécies) das 18.235 existentes descritas para água doce (Figura 5). Destes vertebrados, 69% são peixes, e este número representa, aproximadamente 45% das espécies de peixes que vivem em água doce. A região Neotropical também apresenta os maiores índices de endemismo para

vertebrados, e novamente principalmente representados por peixes (BALIAN et al., 2008).

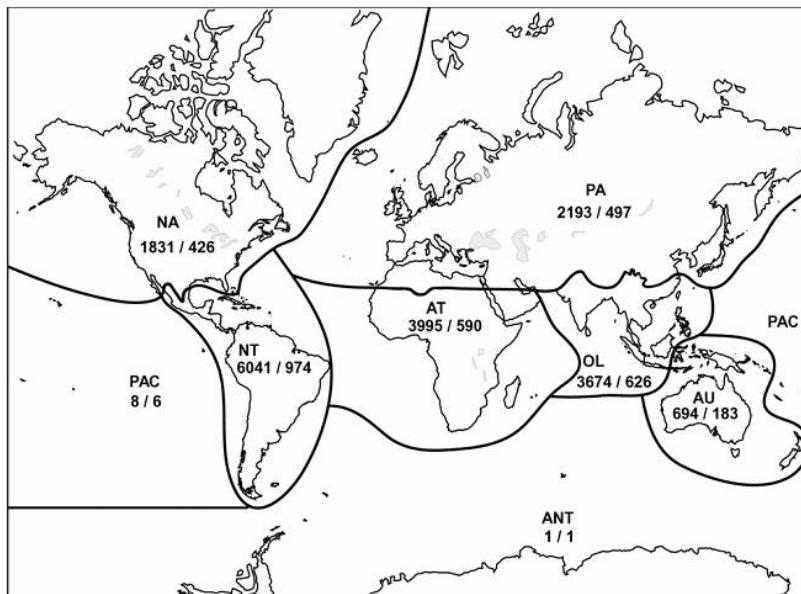


Figura 5 – Distribuição espécies / gêneros de vertebrados de água doce por regiões zoogeográficas. Números incluem estritamente peixes de água doce, anfíbios, mamíferos, répteis e aves aquáticas. PA – Região Paleártica, NA – Região Neártica, NT – Região Neotropical, AT – Região Afrotropical, OL – Região Oriental, AU – Região Austrália, PAC – Região das Ilhas Oceânicas do Pacífico, ANT – Região Antártida (FONTE: BALIAN et al., 2008).

O ambiente de água doce, e por consequência sua biodiversidade, pode ser o ecossistema mais ameaçado do mundo. Uma das razões de sua vulnerabilidade às ações humanas e mudanças ambientais, é a riqueza desigual de águas interiores como habitat para plantas e animais. Isto se confirma, pois aproximadamente um terço das espécies de vertebrados habitam estes ambientes. Uma considerável variação na biodiversidade entre bacias e altos graus de endemismo de peixes e outros grupos de vertebrados aumentam ainda mais o desafio de conservação da biodiversidade de água doce (DUDGEON et al., 2006).

As principais ameaças à biodiversidade aquática apontadas por diversos autores são: poluição, destruição e degradação do habitat, construção de barramentos, alteração no fluxo natural da água, introdução de espécies exóticas, sobre-exploração (Figura 6) (VRIJENHOEK, 1998; AGOSTINHO, THOMAZ e GOMES, 2005; DUDGEON et al., 2006; LÉVÊQUE et al., 2008; GEIST, 2011). Por todos estes motivos, diversos pesquisadores vêm defendendo que os ambientes aquáticos, em especial os de água

doce estão entre os mais ameaçados, e conseqüentemente sua biodiversidade vem sendo perdida em maiores taxas (ABELL, 2002; DUDGEON et al., 2006; GEIST, 2011).

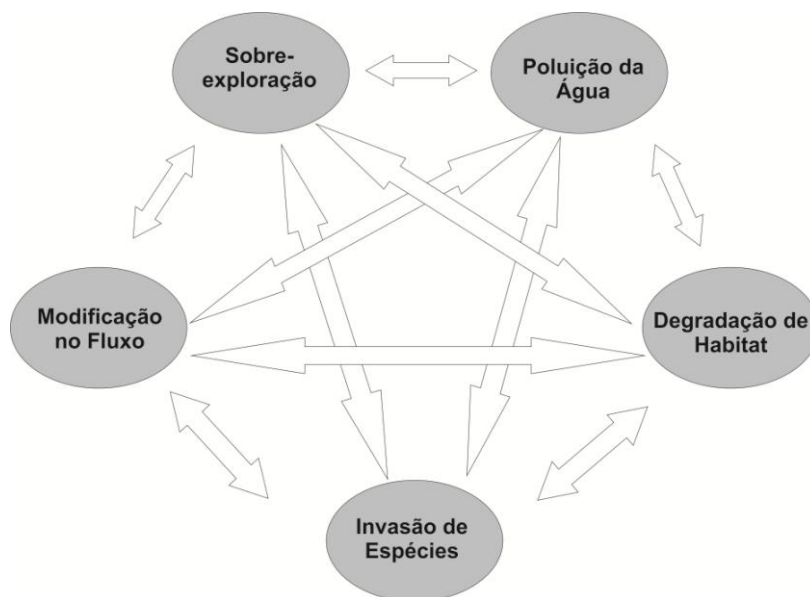


Figura 6 – As cinco maiores categorias de ameaças e seus impactos ou potenciais impactos interativos na biodiversidade de água doce. (Modificado de DUDGEON et al., 2006).

A preservação da biodiversidade de água doce é realmente um dos maiores desafios atuais, por uma série de questões particulares destes ambientes, como sua condição de “receptor” de efluentes oriundos do uso da terra, bem como suas altas taxas de endemismo o que impede a reposição de suas espécies. Para a preservação de um determinado local, não basta preservar pontualmente o ambiente aquático, propriamente dito, uma vez que este é resultado de uma série de interações e pode ser influenciado pela rede de drenagem à montante, pelas áreas terrestres vizinhas de determinado local e sua mata ciliar, bem como por trechos à jusante quando se tratar de migração de fauna aquática (DUDGEON et al., 2006; LÉVÊQUE et al., 2008). Portanto, se quisermos uma ação efetiva de conservação, dentre outras coisas, é necessário o reconhecimento da bacia hidrográfica como unidade de gestão focal, não podemos pensar pontualmente, mas sim na bacia hidrográfica como um todo (DUDGEON et al., 2006).

É imprescindível para a preservação da biodiversidade e exploração sustentável que pesquisadores e “tomadores de decisões” tenham à sua disposição informações disponíveis em uma base de conhecimentos sobre levantamentos de biodiversidade,

incluindo a distribuição de espécies, requisitos das espécies, processos ecológicos e funcionamento dos ecossistemas (AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008).

Fica evidente que há uma falta de comunicação entre a comunidade científica e os órgãos governamentais, gestores e fiscalizadores. As ações de manejo de recursos aquáticos, e no caso dos peixes de água doce, os insucessos nos programas de estocagens e na instalação de mecanismos de transposição deixam clara esta situação conforme apontado por Agostinho e colaboradores (2005). Neste contexto é fundamental que haja uma mudança de mentalidade e comportamentos dos gestores públicos e dos governos sobre o papel dos ecossistemas de água doce e de sua importância para a preservação da biodiversidade. Questões como, aumentar a proporção de pessoas com acesso à água e saneamento básico não podem ocultar o fato de que neste momento a biodiversidade e os recursos biológicos de águas interiores estão enfrentando ameaças sem precedentes, impulsionadas pelo crescimento das ameaças oriundas de atividades humanas (DUDGEON et al., 2006). De maneira análoga, a necessidade de crescimento econômico, quase sempre associada de maneira inerente ao aumento pela demanda energética, não pode justificar os danos e as ameaças de empreendimentos hidrelétricos, por exemplo, sobre a biodiversidade dos ecossistemas aquáticos.

Certamente, são urgentes ações que possibilitem preservar rios e lagos ainda intactos como grandes áreas de preservação onde ainda existe esta oportunidade. Entretanto, mesmo que a preservação destes ambientes e sua biodiversidade ainda seja uma prioridade, é preciso reconhecer que ambientes parcialmente degradados podem também conter uma parte importante de sua biodiversidade original. De fato, a proteção de um ou poucos corpos d'água não pode preservar toda a biodiversidade de uma região, ou mesmo uma porção significativa dentro dela (DUDGEON et al., 2006). Não adiantaria incumbir a uma reserva pontual a esperança de se preservar a biodiversidade de todo um ecossistema, desta maneira, ainda que estejam sofrendo com algum tipo de ação antrópica nenhum ambiente deve ser descartado, ou considerado insignificante para a preservação da biodiversidade e devem fazer parte de projetos ou programas que tenham este foco.

2.4 Diversidade de Peixes no Mundo, no Brasil e no Alto Rio Paraná

Os peixes, certamente constituem o grupo mais diversificado de vertebrados, com aproximadamente 28.000 espécies, representam mais de 50% das espécies e cinco das nove classes de vertebrados. Destas, mais de 12.000 espécies são peixes de água doce (REIS et al., 2003; LÉVÊQUE et al., 2008; BALIAN et al., 2008; HICKMAN Jr et al., 2013).

Atualmente estima-se que existam cerca de 6.000 espécies de peixes de água doce na região Neotropical (REIS et al., 2003); considerando apenas espécies válidas existem mais de 4.000 espécies (Figura 7) (LÉVÊQUE et al., 2008) . No Brasil, particularmente, o número de espécies de peixes de água doce está em torno de 2.587 (BUCKUP et al., 2007).

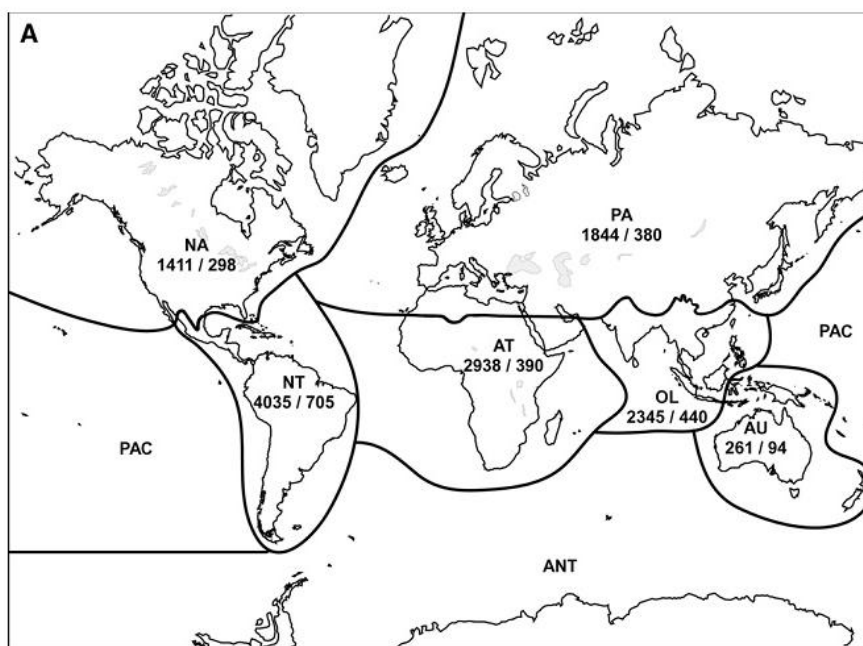


Figura 7 – Mapa das diferentes regiões biogeográficas ilustrando a diversidade de peixes de água doce no mundo. Os valores representam o número de espécies / gêneros por regiões zoogeográficas. PA – Região Paleártica, NA – Região Neártica, NT – Região Neotropical, AT – Região Afrotropical, OL – Região Oriental, AU – Região Australária, PAC – Região das Ilhas Oceânicas do Pacífico, ANT – Região Antártida (FONTE: LÉVÊQUE et al., 2008).

O Brasil, apesar de possuir uma das maiores faunas de peixes dulcícolas do mundo, representando quase 22% das espécies existentes, ainda possui bacias hidrográficas não inventariadas o que dificulta a obtenção de uma estimativa mais precisa do número de espécies existentes (AGOSTINHO, THOMAZ E GOMES, 2005)

É impressionante como os ambientes de água doce que recobrem apenas 1% da superfície da Terra possuem o número estimado de 13.000 espécies de peixes estritamente dulcícolas, enquanto que os ambientes marinhos, que chegam a recobrir 70% da superfície do planeta, possuem aproximadamente 16.000 espécies, ou seja, número este relativamente muito inferior (LÉVÊQUE et al., 2008).

A grande diversificação dos peixes em ambientes de água doce, deve-se em parte ao isolamento geográfico ocasionado pela distribuição em bacias hidrográficas relativamente isoladas, à radiação local e à “barreira salgada”, esta última intransponível para a grande maioria das espécies estritamente dulcícolas. Estas imposições limitam o fluxo gênico e levam à uma considerável variação inter bacia na biodiversidade e altos graus de endemismo (DUGEON et al., 2006).

O isolamento geográfico e posterior isolamento reprodutivo podem conduzir à formação de novas espécies (FUTUYMA, 1992) e podem elevar a variação intraespecífica interbacia para o nível de variação interespecífica, surgindo assim uma espécie nova para uma localidade estrita.

Ainda existem grandes lacunas de conhecimento, tanto geográficas, como taxonômicas, devido à falta de inventários da biodiversidade de água doce, especialmente nas regiões tropicais onde sabidamente há maior diversidade de espécies. Em se tratando de riqueza e endemismo os *hotspots* frequentemente localizam-se em áreas pouco estudadas, como por exemplo, a região Neotropical (DUDGEON et al., 2006; BALIAN et al., 2008; LÉVÊQUE et al., 2008).

No Brasil, ainda existem muitas drenagens não inventariadas, e mesmo em drenagens bem conhecidas geralmente apenas a calha principal foi sistematicamente estudada, enquanto muitos de seus afluentes de menor porte permanecem sem estudos (AGOSTINHO, THOMAZ, e GOMES, 2005; LANGEANI et al., 2007; GALVES, SHIBATTA e JEREP, 2009). Ainda, se desejamos conhecer a diversidade de peixes de uma determinada bacia não podemos nos ater apenas à calha principal, precisamos também buscar informações em pequenos tributários pois estes abrigam sabidamente uma parte importante da diversidade (COSTA et al., 2013a). A Figura 8 revela grandes lacunas de inventários ictiofaunísticos no sistema do Alto rio Paraná, que é certamente a drenagem brasileira melhor estudada, destacamos neste caso a bacia do rio das Cinzas, que até a realização do presente estudo carecia de levantamentos mais abrangentes de

sua ictiofauna, que já havia sido parcialmente inventariada por Hoffmann, Orsi e Shibatta (2005), Vianna e Nogueira (2008) e Orsi (2010).



Figura 8 – Localização dos principais estudos de diversidade íctia realizados no Alto rio Paraná. Seta vermelha aponta a bacia do rio das Cinzas, onde ainda não se apontava a existência de estudos de diversidade ictia. MS – Estado do Mato Grosso do Sul, GO – Estado de Goiás, MG – Estado de Minas Gerais, SP – Estado de São Paulo, PR – Estado do Paraná (FONTE: Modificada de GALVES, SHIBATTA e JEREP, 2009).

Em relação à ictiofauna, a Província Paranaense é uma das 10 províncias da América do Sul, inclui principalmente os rios costeiros da Argentina central, a bacia do rio da Prata e a bacia do rio São Francisco no Brasil, esta província possui aproximadamente 847 espécies das quais 517 são endêmicas, ficando atrás apenas da província Amazônica em riqueza e endemismo (LÉVÊQUE et al., 2008).

2.5 Diversidade Peixes Bacia do Cinzas

Como dito, o rio Laranjinha está inserido na bacia do rio das Cinzas que por sua vez, deságua no rio Paranapanema e, portanto, faz parte do sistema do Alto rio Paraná. O rio Paraná, o qual é formado pela junção dos rios Grande e Paranaíba, é o décimo maior rio do planeta (extensão de 4.695 km e área de drenagem de $2,8 \times 10^8$ ha) e o segundo maior em extensão da América do Sul. Possui a ictiofauna mais estudada da América do Sul e localiza-se em uma das regiões mais densamente povoadas, urbanizadas e industrializadas do país; concomitantemente ao aumento da demanda por água, os usos de consumo, agricultura e pecuária intensos (principalmente com manejo inadequado do solo), uso intenso de agroquímicos, eliminação de vegetação ripária e a introdução de espécies têm comprometido a qualidade da água na maioria dos tributários do Alto rio Paraná. Consequentemente, a água desta bacia está tornando-se inadequada para o uso humano, e vem tornando limitada sua capacidade de suporte para vida aquática. As barragens, que estão entre as atividades humanas mais danosas nesta bacia, tem afetado os principais cursos de rios, especialmente na metade superior do rio Paraná (AGOSTINHO e GOMES, 2005; GRAÇA e PAVANELLI, 2007; AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008).

A região denominada Alto rio Paraná (Figura 9), compreende o terço superior da bacia do rio Paraná; anteriormente à formação do lago de Itaipú, compreendia a região acima do Salto de Sete-Quedas, atualmente a região do Alto rio Paraná é considerada o trecho acima da usina hidrelétrica de Itaipú (AGOSTINHO e GOMES, 2005; GRAÇA e PAVANELLI, 2007). Segundo Castro e colaboradores (2003), a drenagem do Alto rio Paraná, compreende uma área de aproximadamente 900.000 km², incluindo a porção norte do estado do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul, pequena área do Paraguai, que faz divisa com o Mato Grosso do Sul, a maioria do estado de São Paulo localizada a oeste da Serra do Mar, sul de Minas Gerais e sul de Goiás.

Em uma revisão recente baseada em dados de publicações científicas, de coleções e mesmo em novas coletas, foram identificadas para a região do Alto rio Paraná 310 espécies de peixes pertencentes a 11 ordens e 38 famílias, com 80% destas espécies pertencendo às ordens Siluriformes e Characiformes. Ainda, soma-se à este número, pelo menos, 50 espécies novas que aguardam descrição, sendo a maioria destas espécies de riachos e cabeceiras de rios. Entretanto, este número de espécie está ainda

seguramente subestimado, uma vez que espera-se para o Alto rio Paraná a descoberta de novos táxons, ou mesmo o desmembramento de algumas espécies anteriormente tidas como de ampla distribuição (LANGEANI, et al., 2007). Assim, mesmo em regiões tão bem estudadas como o sistema do Alto rio Paraná ainda existem lacunas de localidades que carecem de inventários ictiofaunísticos (GALVES, SHIBATTA e JEREP, 2009).

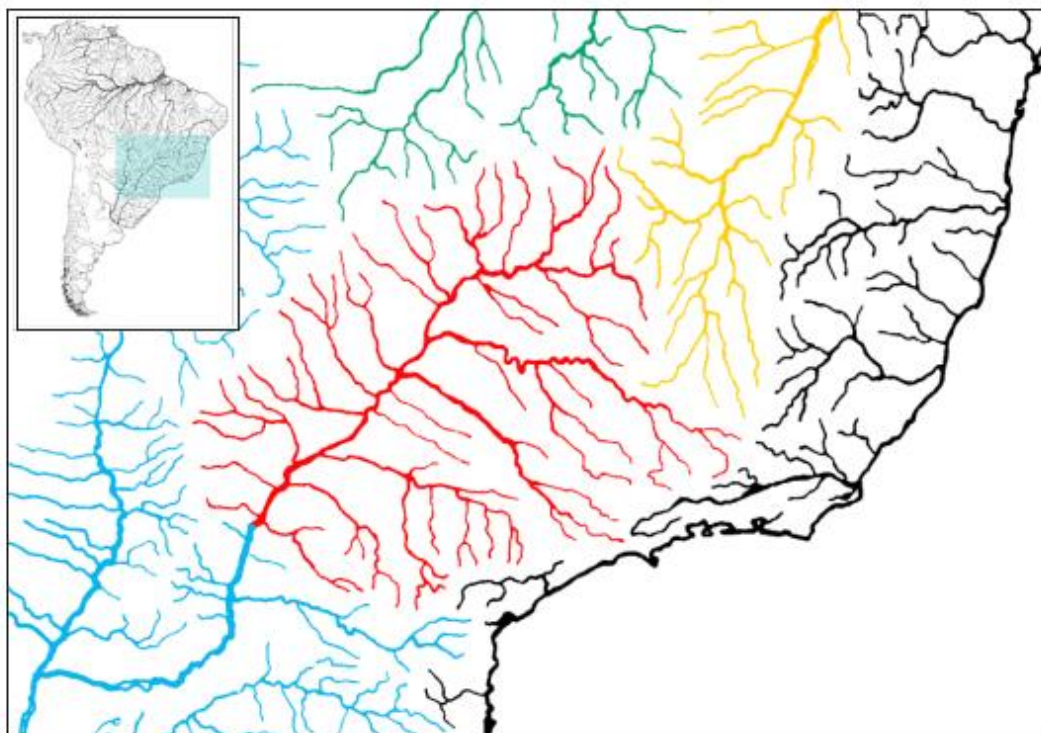


Figura 9 – Sistema do Alto rio Paraná (Vermelho) e bacias vizinhas do Paraguai e Baixo Paraná (Azul) Araguaia/Tocantins (Verde), São Francisco (Amarelo) e rios Costeiros (preto). (FONTE: LANGEANI et al., 2007).

Uma porção significativa das espécies relatadas para o Alto rio Paraná é constituída por espécies não nativas da bacia, ou seja, 74 do total de 310 espécies. Segundo os autores, uma das vias para a introdução destas espécies na bacia foi possivelmente a dispersão à partir do Baixo rio Paraná, após o enchimento do lago de Itaipú que submergiu o Salto de Sete-Quedas; anteriormente, este dividia o Alto e Baixo rio Paraná. Também deve-se destacar o papel dos escapes de pisciculturas, aquariofilia e pesca esportiva como via de entrada de algumas destas espécies na bacia (LANGEANI et al., 2007; AZEVEDO-SANTOS, RIGOLIN-SÁ e PELICICE, 2011)

A bacia do rio das Cinzas apesar de sua importância regional nunca havia sido inventariada por completo; entretanto, pontualmente alguns trabalhos já haviam documentado parcialmente sua ictiofauna. Hoffmann, Orsi e Shibatta (2005) realizaram

um levantamento da diversidade de peixes no reservatório de Capivara, e das 67 espécies capturadas 62 ocorriam na foz do rio das Cinzas, incluindo-se nesta listagem espécies migradoras como *Salminus brasiliensis*, *Prochilodus lineatus*, *Leporinus elongatus* e *Schizodon altoparanae*; a foz do rio das Cinzas também apresentou os maiores índices de diversidade sinalizando para a importância deste rio no sistema do médio rio Paranapanema. Alguns anos mais tarde, Vianna e Nogueira (2008) conduziram um trabalho em oito pontos amostrais no rio das Cinzas e um na foz do rio Laranjinha, estudando ovos e larvas, parâmetros limnológicos e também coleta de peixes juvenis e adultos, os autores registraram 57 espécies de peixes. Coletando apenas na foz do rio das Cinzas Orsi (2010) também encontrou 77 espécies das 79 registradas por ele para o reservatório de Capivara. No entanto, em comparação a rios semelhantes, como o rio Tibagi, para o qual já foram registradas 110 espécies (SHIBATTA, 2002), podemos imaginar que o número de espécies para a bacia do rio das Cinzas ainda é subestimado. Galves, Shibatta e Jerep (2009) chamam a atenção para a importância de se conduzirem estudos complementares em áreas que eventualmente já tenham sido inventariadas em algum nível. Particularmente no caso do rio Laranjinha, apesar da foz deste rio ter sido amostrada por Vianna e Nogueira (2008), estes autores não qualificam sua ictiofauna separadamente, justificando, assim, a realização de maiores estudos sobre a ictiofauna deste importante rio da bacia do rio das Cinzas.

2.6 Genética da Conservação e Marcadores Moleculares

Segundo Solé-Cava e Cunha (2012) o objetivo central da genética aplicada à conservação é utilizar marcadores moleculares, sua interpretação ecológica e evolutiva, para minimizar os danos oriundos de atividades antrópicas às populações das espécies.

Em decorrência de ações antrópicas indesejáveis, recursos genéticos podem ser perdidos diretamente como resultado da extinção de espécies ou pela redução da variabilidade genética dentro das espécies (OLIVEIRA, FORESTI e HILSDORF, 2009). A variabilidade genética é o meio pelo qual uma determinada espécie reage e se adapta a mudanças ambientais. A falta de diversidade genética pode levar a aumentos nos níveis de endogamia que pode reduzir a adaptação de indivíduos e populações. Acessar a diversidade genética é fundamental em estudos de genética de populações e possui aplicações de extrema importância na biologia da conservação (FREELAND,

2005). Para evitar esta perda de recursos genéticos é fundamental a realização de monitoramentos que permitam controlar tanto o número de indivíduos de uma espécie como a variabilidade genética presente em uma população ou espécie.

As tecnologias para análises genéticas têm sido consideradas uma revolução no estudo da biodiversidade, especialmente na região Neotropical que possui uma diversidade muito elevada. Pesquisas que possam gerar dados moleculares são urgentes dado à grande biodiversidade, perda de hábitat e impactos antrópicos (BARLETTA et al., 2010).

Para acessar a diversidade genética das espécies em nível molecular, os estudos em genética da conservação fazem uso de marcadores moleculares, que são definidos por Ferreira e Grattapaglia (1995) como [...] “todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA”. Em termos práticos estas “ferramentas genéticas” são úteis para determinar as prioridades para conservação, como por exemplo, a identificação de populações prioritárias ou áreas de “hotspots” para conservação, auxiliando na retenção do máximo potencial evolutivo das espécies (GEIST, 2011).

Os diversos marcadores genéticos atualmente disponíveis permitem um acesso rápido à variabilidade genética intra e interpopulacional, possibilitam o estudo de estruturação populacional, análise de parentesco e identificação de indivíduos e espécies semelhantes. Desta forma, os marcadores de DNA são extremamente úteis para o desenvolvimento de planos de manejo mais adequados para populações naturais de peixes neotropicais (PIORSKI, 2008)

Atualmente, os marcadores moleculares têm sido aplicados para avaliar a variabilidade genética de populações naturais de peixe a fim de identificar conjuntos gênicos e/ou populações de peixes. A importância desta abordagem está no seu potencial para delimitar áreas prioritárias para a conservação de espécies e o uso sustentável destes recursos (SANCHES e GALETTI JR, 2007).

Apesar de existir uma enorme variedade de métodos desenvolvidos para detectar a variabilidade genética eles podem ser agrupados em apenas três classes conceituais de marcadores segundo Schlötterer (2004):

1. Variantes de proteínas;
2. Polimorfismo de sequência de DNA;
3. Variações de repetições

Nas três últimas décadas diversos marcadores moleculares têm sido aplicados no estudo de diversidade genética em peixes neotropicais, sejam eles enzimáticos (REVALDAVES, RENESTO e MACHADO, 1997; ZAWADZKI et al., 2004; RENESTO, ZAWADZKI e DE PAIVA, 2007), obtidos com base em cortes com enzima de restrição, sem amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Plimerase), tais como RFLP (HILSDORF e KRIEGER, 2004), e principalmente àqueles obtidos a partir da técnica de PCR e suas variações, sejam elas, RAPD (PRIOLI et al., 2002; HATANAKA e GALETTI, 2003; SOFIA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2013), Microsatélites (HATANAKA, HENRIQUE-SILVA e GALETTI, 2006; MATSUMOTO e HILSDORF, 2009; RAMOS et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; RUEDA et al., 2013), AFLP (FERREIRA, 2013), estudo de sequências por meio de PCR-RFLP (HILSDORF et al., 2002; GARCEZ, CALCAGNOTT e ALMEIDA-TOLETO, 2011) e Sequenciamento (SIVASUNDAR BERMINGHAM e ORTÍ, 2001; SANTOS, RUFFINO e FARIAS, 2007; PANARARI-ANTUNES et al. 2008; IERVOLINO, RESENDE e HILSDORF, 2010).

A Figura 10 nos apresenta um cenário mundial da utilização de marcadores moleculares até o ano de 2003, nela é possível notar que os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*, ou em português, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), tão importantes para os estudos genéticos de peixes no Brasil alcançou seu pico de utilização próximo ao ano de 1995, após esta data começa perder lugar para marcadores como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados), este último, entretanto, nunca alcançou patamares elevados de utilização, ao menos no Brasil. Também apresentam um crescimento acentuado o uso de sequencias de DNA e de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* – polimorfismo de nucleotídeo único). É notável, como os marcadores enzimáticos e de RFLP perderam lugar depois de dominarem boa parte do século passado (SCHLÖTTERER, 2004).

A análise de microssatélites está entre os marcadores moleculares mais utilizados em peixes. Dentre os fatores que vêm permitindo o crescimento da utilização desta técnica podemos elencar principalmente: i) a diminuição dos custos de sequenciamentos, que aliada ao surgimento de técnicas mais simples e rápidas para obtenção de bibliotecas enriquecidas de microssatélite possibilitaram o aumento no número de iniciadores disponíveis para diversas espécies; e, ii) a possibilidade de automatização do processo de genotipagem dos produtos de PCR (sequenciadores automáticos), diminuindo consideravelmente o tempo laboratorial.

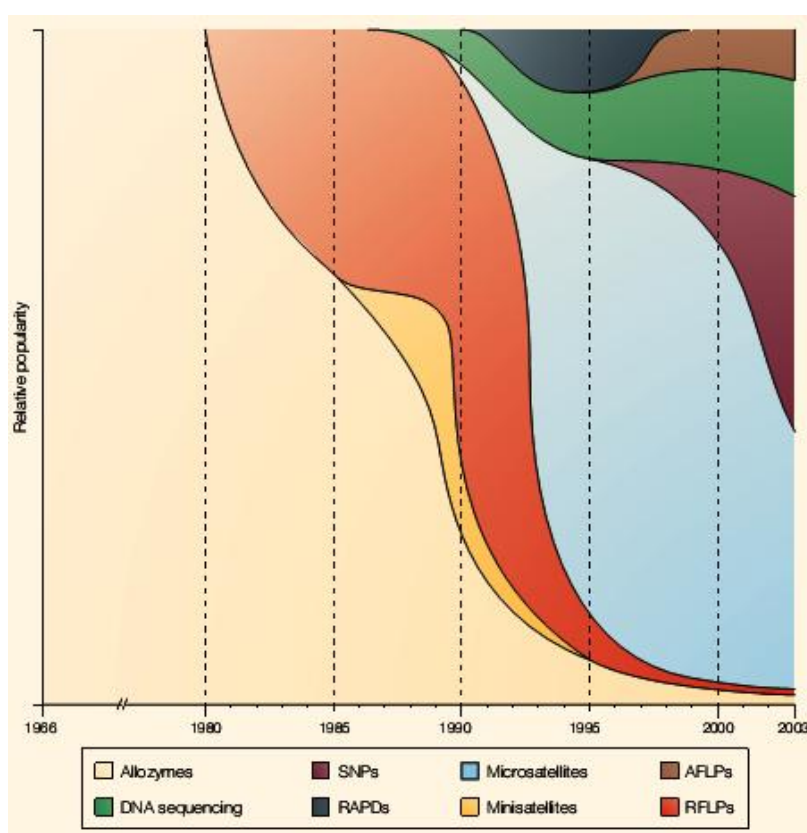


Figura 10 – Visão subjetiva da alteração na importância relativa de diferentes marcadores moleculares aplicados ao estudo de peixes em todo o mundo?. O eixo horizontal indica o tempo, o eixo vertical corresponde ao uso total do marcador molecular, se mais de um marcador é utilizado em um determinado tempo sua importância relativa é refletida pela proporção no eixo vertical. (FONTE: SCHLÖTTERER, 2004)

Os genes mitocondriais também têm sido cada vez mais utilizados, neste caso a diminuição dos custos de sequenciamento, a possibilidade de sequenciamento direto à partir de produtos PCR, o que diminuiu consideravelmente o tempo investido na

obtenção de sequências, e uma grande disponibilidade de “*primers* universais” para maioria dos grupos animais também auxiliaram na popularização desta técnica, seja nos estudos populacionais, filogeográficos ou filogenéticos.

Estes fatores, aliados a uma infinidade de programas computacionais disponíveis (EXCOFFIER e HECKEL, 2006) possibilitaram que os microsatélites e as sequências mitocondriais ganhassem enorme destaque no cenário dos estudos populacionais de peixes nos últimos anos.

DNA mitocondrial e região D-loop

O DNA mitocondrial representa um dos marcadores moleculares mais utilizados em estudos de genética de populações e filogeografia (MCCUSKER e BENTZEN, 2010). Em animais, os marcadores do DNA mitocondrial se tornaram muito populares devido à ausência de recombinação, altas taxas de mutação, pequeno tamanho efetivo populacional e pela disponibilidade de *primers* universais (FREELAND, 2005).

Segundo Allendorf e Luikart (2007) existem três grandes diferenças entre o genoma nuclear e mitocondriais:

1. Indivíduos possuem muitas mitocôndrias que compartilham uma única sequência predominante de DNA mitocondrial, ou seja, são haploides para um único tipo de DNA mitocondrial;
2. Indivíduos herdaram, com algumas exceções, seu DNA mitocondrial de suas mães;
3. Não há recombinação entre as moléculas de DNA mitocondrial.

O DNA mitocondrial (DNAm) é muito abundante, pois cada célula possui inúmeras mitocôndrias e de fácil purificação (ALLENDORF e LUIKART, 2007). O DNA mitocondrial animal é uma molécula circular de fita dupla, em peixes seu tamanho varia pouco ficando entre 15.2 a 19.8 kbp (BILLINGTON e HEBERT, 1991). Uma característica importante deste genoma é a sua herança materna, portanto, não segue um padrão de herança mendeliana. O genoma mitocondrial apresenta uma alta taxa de evolução quando comparado a um gene de cópia única nuclear. Por exemplo, em mamíferos sabe-se que o genoma mitocondrial evolui 5 a 10 vezes mais rápido do que

um gene nuclear (HARTL e CLARK, 2007); em vertebrados, de um modo geral, a região *D-loop* é a que mais acumula mutações e, segundo Santos, Ruffino e Farias (2010), esta pode evoluir a $2,0 \times 10^{-8}$ base/por ano, devido à substituições de bases até inserções e deleções (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010; ARIAS e INFANTE-MALACHIAS, 2012). Mesmo esta alta velocidade de evolução, segundo Padhi (2013b), seria muito lenta para refletir fatores relacionados à interferência antrópica dentro do último século.

O genoma mitocondrial de peixes possui em torno de 16.600 pb, e exhibe a estrutura típica do genoma mitocondrial de vertebrados, possuindo 13 genes codificantes de proteínas, dois genes de RNA ribossômico, 22 genes de RNA transportador e uma região não codificante chamada região de controle (*D-loop*) (Figura 11) (FISCHER, et al., 2013)

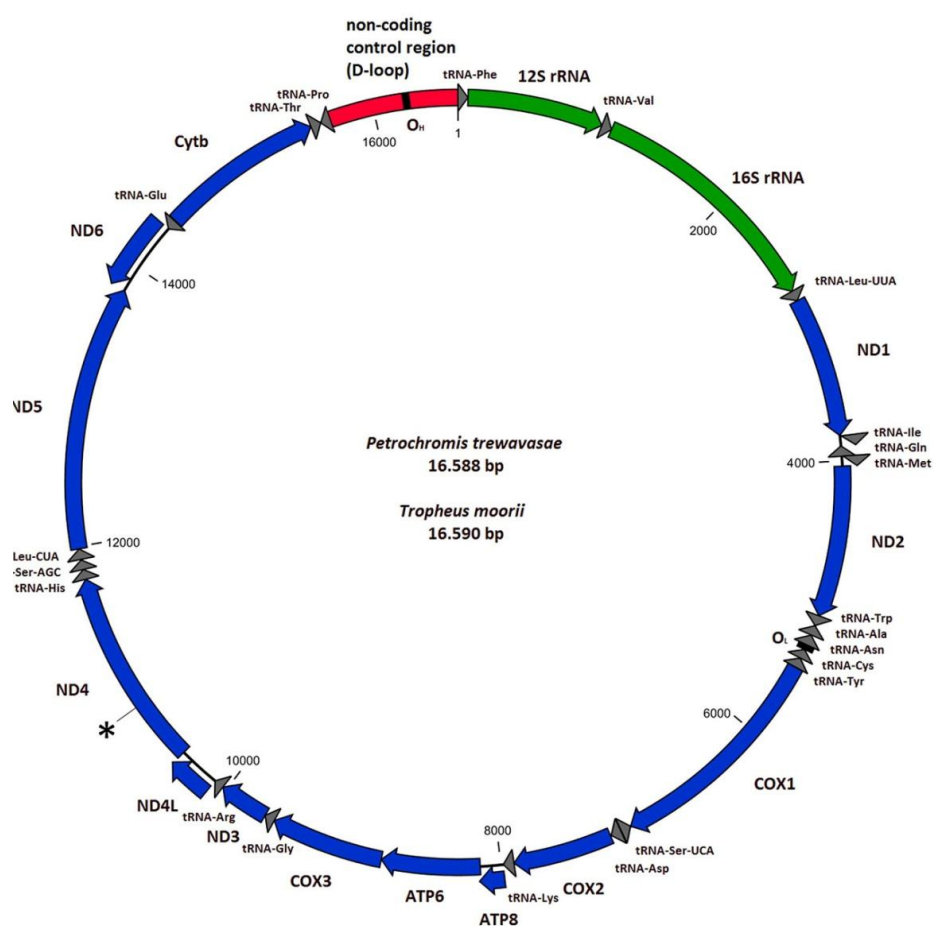


Figura 11 – Estrutura do genoma mitocondrial em *Petrochromis trewavasae* e *Tropheus moorii*. 13 genes codificantes de proteínas da cadeia respiratória (ND1, ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6 e CYTB), 22 genes de RNA transportador, 2 genes de RNA ribossômico (12S e 16S rRNA) e a região não codificante (*D-loop*). (FONTE: FISCHER et al., 2013)

Diversos autores vêm utilizando a região *D-loop* em estudos com peixes neotropicais, sejam em estudos filogenéticos, filogeográficos ou que busquem a diversidade e estrutura genética em populações naturais ou em cativeiro. Existem vários pares de *primers* descritos para esta região que depois de amplificada, tem tido sua diversidade acessada tanto por sequenciamento como por cortes com enzimas de restrição (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001; HILSDORF et al., 2002; PRIOLI et al., 2002; MARTINS et al., 2003; SANTOS, RUFFINO e FARIAS, 2007; ORTÍ et al., 2008; IERVOLINO, RESENDE e HILSDORF, 2010; WANG et al., 2010; GARCEZ, CALCAGNOTO e ALMEIDA-TOLEDO, 2011).

A região *D-loop* foi utilizada para detectar a *panmixia* em *Prochilodus magdalenae* na bacia do rio Magdalena, na região Neotropical, a grande capacidade de migração e ausência de barreiras geográficas foram atribuídas como fatores responsáveis pelo cenário encontrado. Os resultados obtidos por estes autores também indicaram uma possível expansão populacional na metade do Pleistoceno (AGUIRRE-PABÓN; BARANDICA; GARCÍA, 2013). Esta mesma região do DNA mitocondrial foi utilizada para análise populacional em *Prochilodus lineatus*, e apesar da região *D-loop* apresentar uma filogenia bem resolvida, formando um grupo monofilético para cada bacia estudada, não houve uma associação de populações desta espécie com a distribuição geográfica da mesma. Os autores conseguiram detectar altos níveis de diversidade genética para a sequência da região *D-loop* (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001).

Em *Hypostomus* a região *D-loop* foi utilizada por Montoya-Burgos (2003) para traçar o padrão filogeográfico do gênero, indicando que este gênero de Siluriformes pode ser dividido em quatro clados monofiléticos; este autor também encontrou que após calibragem de um relógio molecular foi possível associar alguns eventos cladogênicos à algumas mudanças hidrogeológicas previamente documentadas.

Santos, Ruffino e Farias (2007) encontraram grande variabilidade genética na região *D-loop* de *Colossoma macropomum* coletados ao longo de 2.200km no canal principal do rio Amazonas. A diversidade genética foi tamanha que em 48 indivíduos analisados foram encontrados 47 haplótipos diferentes. Estes indivíduos não apresentaram nenhuma estruturação genética, portanto, foram todos considerados como

pertencentes à uma população panmítica. Segundo os autores, estes resultados são coerentes e se completam, pois altos níveis de diversidade genética são comumente observados em espécies migradoras que conseguem manter grandes populações panmíticas, as quais, deste modo, são capazes de contrabalancear os efeitos danosos da deriva genética sobre a variabilidade genética.

A sequência mitocondrial do *D-loop* também foi utilizada em associação com outros marcadores nucleares para verificar se os dois morfotipos de *Brycon cf. pesu* encontrados na bacia dos rios Araguaia-Tocantins tratavam-se de espécies diferentes. Esta hipótese foi rejeitada pelos autores devido à falta de polimorfismo detectada pelos marcadores utilizados (PANARARI-ANTUNES et al., 2008)

Apesar de que todos os marcadores moleculares quantificam as variações no DNA, apenas o sequenciamento pode detectar uma diferença exata em um par de bases entre indivíduos, esta é uma característica importante, uma vez que deixa pouco espaço para ambiguidades, pois ao se comparar as sequências é possível inferir onde e como dois indivíduos são diferentes (FREELAND, 2005)

Apesar de sua comprovada eficiência, alguns autores vêm recomendando o uso de marcadores nucleares tais como os microssatélites para complementar os dados dos marcadores mitocondriais (GARCEZ, CALCAGNOTTO e ALMEIDA-TOLEDO, 2011; HOLLANDA CARVALHO, 2011), possivelmente pelas limitações impostas por algumas de suas características como a herança uniparental e a ausência de recombinação.

Microssatélites

Os marcadores microssatélites ou SSR (Sequências Simples Repetidas) são repetições em *tandem* de pequenas sequências, também chamada de motivos, que podem variar em repetições de um a dois até seis pares de bases segundo diferentes autores: 1 a 4 (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995), 1 a 5 bases (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010), 1 a 6 (OLIVEIRA et al., 2006) e 2 a 4 (DeWOODY e AVISE, 2000). São marcadores codominantes de herança mendeliana, amplamente dispersos pelos cromossomos (DeWOODY; AVISE, 2000). Geralmente são localizados em regiões não codificantes do DNA, portanto, são considerados marcadores neutros

(FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010). A variação no número de repetições de um loco produz uma abundância de alelos diferenciados pelo peso molecular (DeWOODY e AVISE, 2000).

Os marcadores microssatélites possuem elevadas taxas de mutação; em uma espécie de peixe esta taxa foi estimada em $5,56 \times 10^{-4}$ locos/geração (YUE, DAVID e ORBAN, 2007). São amplificados via PCR utilizando sequências únicas conservadas que flanqueiam os microssatélites como iniciadores (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010). Este fato é a principal limitação para a utilização desta técnica que necessita do conhecimento prévio do genoma da espécie para a construção de iniciadores (*primers*), um processo que geralmente envolve a construção de bibliotecas genômicas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010; MATIOLI e PASSOS-BUENO, 2012). Embora, iniciadores de espécies filogeneticamente mais relacionadas frequentemente funcionem bem para amplificar regiões do genoma de espécies para as quais iniciadores não foram especificamente produzidos (BARBOSA et al., 2008; PIORSKI et al., 2008; ZAGANINI et al., 2012).

A técnica de microssatélite é sem dúvida uma das mais utilizadas na detecção de polimorfismo em genética de populações (ALLENDORF e LUIKART, 2007). Por suas características de co-dominância e multialelismo possuem elevados conteúdos de informação de polimorfismo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995), são sensíveis na detecção de declínio de diversidade genética pela redução de heterozigose ou de diversidade alélica em populações pequenas e fragmentadas (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010). Em uma revisão de literatura sobre o uso da genética molecular em peixes neotropicais podemos verificar que estes marcadores têm sido amplamente empregados com sucesso, conforme revisto por Piorski (2008) que os considera os marcadores moleculares mais utilizados em pesquisas em peixes.

Espécies e gêneros com grande importância para pesca geralmente possuem conjuntos de *primers* de microssatélite disponíveis. Como é o caso dos membros da família Prochilodontidae (CASTRO e VARI, 2003), onde se insere o gênero *Prochilodus*, que representa 11% da pesca extrativista continental do Brasil (BRASIL, 2012) e possui diversos conjuntos de *primers* disponíveis: *Prochilodus lineatus* (YAZBECK e KALAPOTHAKIS, 2007; BARBOSA et al., 2008; RUEDA et al.,

2011); *Prochilodus costatus* (CARVALHO-COSTA, HATANAKA e GALETTI, 2006; BARBOSA et al., 2008); *Prochilodus argenteus* (BARBOSA et al., 2008, 2006). O gênero *Leporinus*, ao qual pertencem os peixes popularmente conhecidos como piaus e piaparas possui um conjunto de *primers* disponíveis para *Leporinus macrocephalus* (MORELLI et al., 2007), mas que possuem amplificação cruzada satisfatória para outras espécies do gênero, tais como *L. elongatus*, *L. obtusidens* e *L. friderici*.

Os peixes popularmente conhecidos como pacús também possuem locos de microssatélites caracterizados para *Piaractus mesopotamicus* (CALCAGNOTTO, RUSSELLO e DESALLE, 2001), assim como os pacús, os tambaquís pertencem à família Serranidae e possuem alguns conjuntos de *primers* desenvolvidos para *Colossoma macropomum* (SANTOS, HRBEK e FARIAS, 2009; HAMOY et al., 2011).

O gênero *Brycon*, possui grande importância econômica, pois são utilizados para a alimentação, pesca, criação em cativeiro e para o turismo em algumas regiões (SABINO e ANDRADE, 2003; LIMA, 2003; NELSON, 2006), além disto, este gênero possui seis espécies ameaçadas de extinção (ROSA e LIMA, 2008), atrelados à esta importância três conjuntos de *primers* foram caracterizados para o gênero, *Brycon hilarii* (SANCHES e GALETTI JR, 2006), *Brycon opalinus* (BARROSO et al., 2003), *Brycon cephalus* (MATSUMOTO; e HILSDORF, 2009). O gênero *Salminus*, ao qual pertencem os dourados, extremamente apreciados na pesca esportiva, possuem *primers* descritos para algumas espécies: *Salminus hilarii* (SILVA e HILSDORF, 2011); *Salminus franciscanus* (ROSSINI et al., 2010); *Salminus brasiliensis* (RUEDA et al., 2011b).

Outra ordem muito importante para a ictiofauna sul americana é a ordem Siluriformes, a qual pertence o gênero *Pseudoplatystoma*, popularmente conhecidos como pintados e cacharas, que possuem locos de microssatélite desenvolvidos para *P. corruscans* (REVALDAVES et al., 2005) e *Pseudoplatystoma punctifer* (SAULO-MACHADO et al., 2011). Outras espécies de pimelodídeos possuem *primers* de microssatélite já descritos, tais como o mandi amarelo, *Pimelodus maculatus* (PAIVA e KALAPOTHAKIS, 2008), e os grandes bagres amazônicos *Brachyplatystoma rousseauxii* (BATISTA et al., 2010) e *Brachyplatystoma vaillantii* (RODRIGUES et al., 2009) e o jaú, *Zungaro jahu*, da bacia do Paraná-Paraguai, sendo este último muito popular na planície de inundação do Pantanal (CARRILLO-AVILA et al., 2009). A

espécie amazônica de Tucunaré *Cichla piquiti* possui *primers* de microsatélite desenvolvidos para a mesma (CARVALHO et al., 2009).

Segundo o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2012), as espécies acima podem somar aproximadamente 118.189 toneladas de pescado, o que representa 47,48% da pesca extrativa continental do ano de 2010, entretanto, é difícil definir precisamente este valor, pois o documento citado trata as espécies pelos seus nomes populares. Ainda assim é possível perceber a pressão que tais espécies podem sofrer em todo país, soma-se o fato da maioria delas configurarem-se como grandes migradores e ainda com interesse para aquicultura e podemos entender o grande esforço empregado no desenvolvimento de marcadores microsatélites que certamente poderão auxiliar muito no manejo e conservação destes estoques.

Algumas espécies com menor interesse comercial, mas de enorme importância ecológica, possuem conjuntos de *primers* disponíveis, tratam-se de espécies de menor porte, geralmente não migradoras. Dentre os Characiformes podemos destacar os lambaris ou piavas tais como *Astyanax fasciatus* (STRECKER, 2003) e *Astyanax altiparanae* (ZAGANINI et al., 2012), sendo ambas as espécies muito comuns no sistema do Alto rio Paraná, além da espécie de traíra *Hoplias malabaricus* (GONDIM et al., 2010). Algumas espécies de pequenos siluriformes, tais como *Hypostomus gymnorhynchus* (TELLES et al., 2010), pertencente ao gênero mais especioso da família Loricariidae e *Microglanis cottoides* (SOUZA-SHIBATTA et al., 2013), uma pequena espécie de pseudopimelodídeo tem disponíveis *primers* de microsatélite. Uma importante espécie de Perciforme amplamente distribuída por rios, riachos e reservatórios, popularmente conhecida como Cará ou Acará, *Geophagus brasiliensis* possui *primers* de microsatélite recentemente descritos (FERREIRA et al., 2013). A ordem Gymnotiformes também possui marcadores caracterizados para *Eigenmannia* sp. (MOYSÉS et al., 2005).

Como percebe-se nos parágrafos anteriores a maioria das descrições de locos de microsatélite disponibilizados para as espécies neotropicais ocorreu apenas no século atual. Este advento possibilitou que tais marcadores começassem a se popularizar nos estudos de diversidade genética em peixes, e gradativamente pudessem substituir outros marcadores tais como RAPD (Figura 10).

Na região logo abaixo da UHE Três Marias, no rio São Francisco, as análises de microsatélite indicaram a existência de uma única população panmítica de *Prochilodus costatus* (CARVALHO-COSTA, HATANAKA e GALETTI JR, 2008). No entanto, na mesma localidade, populações de *Prochilodus argenteus* apresentaram uma leve, mas significativa estruturação genética. Tal fato, reforçado pela grande heterozigosidade e pelo grande número de alelos exclusivos em uma das localidades, revelou a existência de unidades reprodutivas diferentes em uma mesma localidade (HATANAKA, HENRIQUE-SILVA e GALETTI JR, 2006).

Uma situação semelhante também foi observada no rio Uruguai para *Prochilodus lineatus*, onde detectou-se em uma mesma localidade a presença de três *pools* gênicos diferentes considerando amostras coletadas em diferentes estações do ano, evidenciando a presença de diferentes estoques migratórios ao longo do ano (RUEDA et al., 2013).

O papel das lagoas marginais na região do médio rio São Francisco foi revelado pela ausência de estruturação entre os indivíduos coletados nas lagoas e aqueles coletados na calha principal do rio para as espécies *Prochilodus costatus* e *Prochilodus argenteus*, evidenciando um grande número de migrantes entre estes ambientes, o que é condizente com a biologia reprodutiva da espécie nesta região (MELO et al., 2013).

Para outra espécie de grande valor econômico e com uma grande área de ocorrência, *Piaractus mesopotamicus*, foram coletadas amostras de localidades dentro e fora do Pantanal. Utilizando marcadores microsatélite os autores puderam concluir que dentro do Pantanal as amostras formam uma população panmítica, entretanto, quando comparadas à amostra do rio Paranapanema foi possível identificar uma estruturação significativa; os autores sugerem que este cenário pode ser explicado pelo longo histórico de implantação de usinas hidrelétricas nos rios Paraná e Paranapanema, e sugerem que lotes diferentes para Pantanal e Paranapanema devem ser formados em programas de estocagem (CALCAGNOTTO e DESALLE, 2009).

Abreu e colaboradores (2009), ao analisar duas amostras de *Pseudoplatystoma reticulatum* provenientes de diferentes rios da bacia do Alto rio Paraguai, observaram por meio das análises de F_{ST} , R_{ST} , AMOVA e análise de atribuição Bayesiana, uma pronunciada diferenciação genética, concluindo que as duas amostras tratavam-se de duas populações distintas, com baixo número de migrantes entre elas. Estes dados

foram reforçados ainda pelo grande número de alelos privados encontrados. Estudando outra espécie do mesmo gênero, *P. corruscans*, em seis localidades da bacia do rio Paraná-Paraguai, a hipótese de panmixia também foi rejeitada e igualmente foi observada diferenciação genética significativa entre as amostras (F_{ST} e AMOVA), com a análise de agrupamentos bayesianos também apontando um K mais provável de seis, o que confirmou a separação dos peixes em seis grupos. De acordo com os autores do estudo, o comportamento de *hoaming* poderia explicar este cenário de estruturação genética encontrado para esta espécie (PEREIRA, FORESTI e OLIVEIRA, 2009).

Os marcadores microssatélites puderam identificar híbridos entre as espécies *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*, o que pode garantir maior segurança em programas de estocagem, evitando a propagação de material genético em populações selvagens, uma vez que neste caso os híbridos são sabidamente férteis e se reproduzem na natureza (CARVALHO et al., 2013).

Todos estes exemplos, demonstram como os marcadores microssatélites vêm auxiliando no estudo de peixes de água doce neotropicais, possibilitando análises da estrutura de populações, auxiliando na compreensão de como as populações se encontram distribuídas em sua área de ocorrência, separando diferentes estoques que podem ocupar determinada área, identificando possíveis rotas migratórias, auxiliando na compreensão de comportamento reprodutivo, além de outras informações que nos permitem compreender melhor a biologia da espécie; deste modo, traçar estratégias de manejo e conservação realmente eficientes e que auxiliem na preservação da biodiversidade dos indivíduos, populações e espécies.

Os marcadores de microssatélite, por sua característica codominante, permitem discriminar indivíduos homocigotos de heterocigotos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995) e é possível observar se uma população ou loco está ou não em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Entretanto, algumas peculiaridades apontadas por Pereira, Foresti e Oliveira (2009) podem induzir desvios do EHW em análises por microssatélites: o alto número de alelos por loco, ocorrência de erros de genotipagem por alelos nulos, ocorrência de bandas espelho, e alelos “drop-out”, efeito de Wahlund, seleção de alelos específicos e endocruzamento.

A presença de alelos nulos, que são resultados da não amplificação de um alelo devido à ocorrência de mutação no sítio do anelamento do *primer*, ou por se tratarem de

alelos muito grandes ou pequenos, podem levar a genotipagem de um heterozigoto como um homozigoto (WARD, 2002) e assim causar deficiência no número de heterozigotos.

O “*large allele dropout*” é um problema similar aos alelos nulos, e ocorre quando a amplificação de um alelo atrapalha a amplificação do outro, e é mais frequente quando ocorre grande diferença de tamanho entre os alelos. Nos picos do eletroferograma o alelo maior aparecerá com um pico muito menor do que o alelo menor, e se a quantidade de DNA for muito baixa este pode nem aparecer. Como resultado também irá gerar uma superestimativa de homozigose e, conseqüentemente, uma estimativa tendenciosa da frequência alélica (BJÖRKLUND, 2005).

Quando não há evidências de alelos nulos ou “*large allele dropout*”, o efeito de Wahlund pode ser utilizado para explicar a deficiência observada de heterozigotos em relação ao esperado no EHW; este efeito pode ocorrer quando os dados de duas ou mais subpopulações, com diferentes frequências alélicas são combinadas, neste caso a proporção de homozigotos será maior na amostra agregada do que seria se as populações fossem analisadas de maneira separada, desta forma, pode-se realizar uma análise equivocada, pois duas populações que separadamente poderiam estar em EHW quando analisadas juntas, devido ao efeito Wahlund, não aparentam estar (FREELAND, 2005).

Os desvios do EHW naturalmente podem resultar de um ou mais fatores, por exemplo, acasalamentos não aleatórios, como endocruzamento, seleção natural ou pequeno tamanho populacional, podendo ser difícil determinar exatamente qual destes fatores é o responsável pelas diferenças encontradas entre H_o e H_e (FREELAND, 2005). Desta forma, os valores de F_{IS} , que podem ser interpretados como coeficiente de endogamia, representam uma medida do desvio das frequências genotípicas daquelas esperadas em panmixia, na forma de deficiência ou excesso de heterozigotos (MOREIRA, 2007).

Se as populações tornam-se pequenas por alguma razão, elas se tornam mais endogâmicas, promovendo mais redução no tamanho populacional e aumentando a endogamia. Ao mesmo tempo, populações menores perdem variação genética e conseqüentemente apresentam uma redução em sua habilidade de se adaptar e evoluir às mudanças ambientais. Esta interação entre tamanho populacional reduzido, perda da

diversidade genética e endogamia é referida como vórtice de extinção (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010).

As estatísticas F propostas por Wright (1951) utilizam-se de coeficientes de endogamia para descrever a partição da variação genética dentro e entre populações e podem ser calculadas em três níveis (F_{IS} , F_{ST} e F_{IT}). O F_{IS} mede o grau de endogamia dentro dos indivíduos em relação ao restante da população e é calculado pela fórmula: $F_{IS} = (H_s - H_I)/H_s$ onde, H_s é a heterozigosidade que seria esperada se a população estivesse no EHW), e H_I é a heterozigosidade observada no momento da análise (FREELAND, 2005). Observando esta fórmula, fica evidente que quando for detectado mais heterozigotos na população do que o esperado no EHW teremos um valor de F_{IS} negativo, ao contrário, quando observarmos menos heterozigotos do que o esperado para o EHW teremos um F_{IS} positivo. Assim, valores significativos de F_{IS} encontram-se associados a desvios no EHW e podem evidenciar excesso de heterozigotos na amostra, quando são negativos, ou deficiência, quando positivos. Por exemplo, em estudos no gênero *Brycon* diversos autores encontraram populações que apresentavam desvios significativos do EHW, López (2006) e Barroso et al. (2005) encontraram um F_{IS} positivo indicando déficit de heterozigotos nas amostras estudadas, por outro lado, Rodriguez-Rodriguez et al. (2010) e Matsumoto e Hilsdorf (2009) detectaram excesso de heterozigotos e valores negativos de F_{IS} .

O *bottleneck* (ou efeito de gargalo de garrafa) populacional reduz o tamanho efetivo das populações e, conseqüentemente, o nível de diversidade genética. A severidade do *bottleneck* depende do tamanho ao qual a população foi reduzida e do tempo que demorou para se recuperar. Em geral, a perda inicial de alelos é proporcional à redução no tamanho populacional, e usualmente os alelos raros são aqueles com maior chance de serem perdidos (FREELAND, 2005). Isto frequentemente é associado a uma queda no H_e , porque uma diminuição nos alelos diminui a frequência de heterozigotos esperados no EHW, ao mesmo tempo os valores de H_o podem não cair, chegando a apresentar um aumento temporário comparado ao que se esperaria no EHW (FREELAND, *op. cit.*).

2.7 Análise da diversidade e estrutura genética em peixes na bacia do rio Paranapanema

Pesquisas que têm por objetivos detectar a diversidade e estrutura genética entre populações de peixes, com base no uso de marcadores moleculares, vêm sendo desenvolvidas sistematicamente no rio Paranapanema desde os anos 90. Recentemente, a represa de Capivara e o complexo Canoas, na porção média do Paranapanema, vêm recebendo especial atenção.

A espécie *Astyanax altiparanae* foi estudada dentro da represa de Capivara e também comparando este reservatório com outros dois um localizado na porção alta (Jurumirim) e outro na porção Baixa (Rosana), utilizando a técnica de RAPD, os autores encontraram um nível significativamente menor de diversidade genética no reservatório de Rosana, a população deste reservatório também apresentou uma diferenciação genética muito grande, segundo os parâmetros propostos por Wright (1978) em relação às porções média e alta do rio, evidenciando a existência de populações geneticamente diferenciadas ao longo do rio, e mesmo dentro da represa de Capivara em menores proporções houve diferenciação genética, esta informações são de relevante importância para a preservação desta espécie (LEUZZI et al., 2004).

Caso a estruturação não seja respeitada em programas de repovoamento ou estocagem, a espécie pode sofrer sério danos em sua diversidade, estrutura genética podendo mesmo provocar a perda de adaptações locais (LORENZEN, BEVERIDGE e MANGEL, 2012).

Neste contexto, devemos destacar a soltura de mais de 230.000 exemplares de *A. altiparanae* em pelo menos três localidades diferentes da bacia do rio Paranapanema, rio Vermelho, Água dos Fumeiros e Ribeirão São Luiz (SEAB – Comunicação Pessoal), este último na bacia do rio das Cinzas. Conforme demonstrado por Leuzzi e colaboradores (2004), sem um estudo prévio de estrutura genética de populações de uma espécie, muito da diversidade e estrutura genética além de adaptações locais podem se se perder em ações deste tipo.

Populações de outras espécies de peixes consideradas como grandes migradores também foram estudadas nas escadas de transposição do complexo Canoas, incluindo a escada de Canoas I, que permite a ascensão dos peixes da represa de Capivara, e a

escada de Canoas II, que permite que os peixes de Canoas I possam ascender ao seu reservatório. Considerando que não há escada de transposição de peixes entre a represa de Capivara e o reservatório de Taquaruçu, e nem entre a represa de Canoas II e o reservatório de Salto Grande, podemos verificar aqui uma espécie de “sistema fechado” entre Capivara, Canoas I e Canoas II (Figura 1) (PAULA, 2006; ASHIKAGA, 2008; RAMOS et al., 2012).

Três espécies de grandes migradores foram estudadas nas escadas de transposição de Canoas I e II, por meio dos marcadores RAPD e microssatélite: *Prochilodus lineatus* (PAULA, 2006), *Leporinus friderici* (ASHIKAGA, 2008) e *Leporinus elongatus* (RAMOS et al., 2012). Nas três situações os autores encontraram grande diversidade genética para as espécies e as amostras de diferentes datas e escadas de transposição foram consideradas provenientes de uma única população para cada espécie, ou seja, os peixes que ascendiam de Capivara em direção à Canoas I e, posteriormente, deste reservatório em direção à Canoas II foram considerados uma única população em cada espécie. No caso particular de *L. elongatus*, os autores atribuem algum nível de estruturação genética a presença de uma sub-estruturação populacional, e alertam que a manutenção dos bons níveis de diversidade genética podem estar seriamente comprometida em virtude de um coeficiente de endogamia significativo observado. Evidências adicionais de ameaças à diversidade genética destas espécies foram fornecidas por Paula (2006), que chama atenção para a diminuição dos estoques desta espécie após a abertura das escadas de transposição do complexo Canoas, esta possível depleção dos estoques pode causar diminuição da variabilidade genética e conseqüentemente comprometer o futuro da espécie.

A espécie *Salminus brasiliensis*, popularmente conhecida como dourado, também foi alvo de estudos no complexo Canoas, à exemplo das outras espécies migradoras mencionadas anteriormente as análises de RAPD indicaram baixa diferenciação genética, e novamente as amostras das escadas de Canoas I e II foram consideradas uma única população provavelmente advinda do reservatório de Capivara e no caso deste reservatório os tributários Cinzas e Tibagi teriam condições para que esta espécie conclua seu ciclo reprodutivo. Ainda, os autores encontraram níveis de diversidade genética moderados ($\bar{P} > 42\%$), entretanto abaixo de outras espécies migradoras (LOPES et al., 2007).

São raros os trabalhos que tem por objetivo estudar a diversidade e estrutura genética de espécies de pequeno porte dentro de ribeirões. Entretanto, no ribeirão Cambé, pertencente à bacia do rio Tibagi, que por sua vez é um dos principais afluentes da represa de Capivara, foram realizadas análises genéticas, utilizando a técnica de RAPD, para as espécies *Astyanax scabripinnis* (SOFIA et al., 2006) e *Hypostomus ancistroides* (SOFIA et al., 2008). As amostras de *A. scabripinnis* apresentaram altos níveis de diversidade genética, compatíveis com valores encontrados na literatura para o gênero, enquanto que a espécie *H. ancistroides* apresentou níveis significativamente menores, o que parece ser típico desta e de outras espécies de *Hypostomus* (ZAWADZKI et al., 2005). Quanto à estruturação genética observada entre as diferentes amostras, as duas espécies apresentaram populações estruturadas mesmo em distâncias inferiores à 4 km para *A. scabripinnis* e 7 km para *H. ancistroides*.

Paiva e colaboradores (2005) estudaram três espécies do gênero *Hypostomus*, por meio de isoenzimas, em um ribeirão na bacia do rio Pirapó, afluente do reservatório de Rosana, com o objetivo de verificar se havia isolamento reprodutivo entre as três supostas espécies. Os resultados confirmaram a existência de três populações geneticamente distintas e assim como observado por Sofia et al. (2008) as três espécies apresentaram baixos níveis de diversidade genética, entretanto, os autores discutem que este fato não parece ser a regra para o gênero.

Devido às ações de estocagem adotadas como forma de mitigação dos impactos causados pelas barragens adotarem nas últimas décadas o uso de espécies nativas de cada bacia (AGOSTINHO, 1994; AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008) aumentou-se o interesse e a necessidade em se estudar a genética dos estoques de reprodutores, bem como da prole de juvenis que será solta, tendo em vista minimizar os efeitos da endogamia, deriva e conseqüente perda da diversidade. Entretanto, a estrutura das populações nativas quase nunca é levada em consideração nestas ações.

Neste contexto, estoques de reprodutores oriundos do rio Paranapanema são mantidos em algumas estações de piscicultura e frequentemente utilizados em programas de estocagem.

Almeida e colaboradores (2013) estudaram um estoque selvagem mantido em cativeiro da espécie *S. brasiliensis*, coletados no complexo Canoas, bem como a prole formada a partir de alguns reprodutores deste estoque selvagem. Os autores observaram

uma redução significativa (2% e 3%) da diversidade genética entre o lote de reprodutores e os lotes de proles formados, também observaram uma diferenciação genética moderada entre os lotes da prole e o lote de reprodutores. Entretanto, apesar da redução na variabilidade genética os valores ainda eram semelhantes àqueles encontrados para populações selvagens estudadas por Lopes e colaboradores (2007) nas mesmas localidades.

Alemeida et al., (2013) observaram que o manejo adequado da prole antes da soltura poderia reduzir a estruturação entre prole e reprodutores. Este trabalho, evidencia a importância do acompanhamento genético não apenas da diversidade genética, mas também da estrutura das populações, pois, desta forma é possível preservar diversidade genética sem interferir na estrutura das populações selvagens, demonstrando como o simples acompanhamento e aconselhamento evita possíveis perdas genéticas.

Duas populações de reprodutores de curimba, *P. lineatus*, são mantidas em duas estações de piscicultura diferentes, uma das populações é oriunda do rio Paraná (estação de piscicultura Palotina) e outra oriunda do rio Paranapanema (estação de piscicultura de Salto Grande). O lote de reprodutores do rio Paranapanema possui uma proporção de locos polimórficos de 80,95%, enquanto que na população de reprodutores do rio Paraná esta proporção é de 85,71%. No entanto, quando analisou-se a prole dos reprodutores do rio Paraná observou-se uma redução da proporção de locos polimórficos para 79,37%, ou seja, uma redução de 7,4% neste índice de diversidade genética (LOPES et al., 2008).

Os estoques de *Piaractus mesopotamicus* da estação de piscicultura de Salto Grande também foram comparados à uma população selvagem (escadas de transposição de Canoas I e II), utilizando-se marcadores RAPD para estimar a diversidade genética destas populações, foi observado que todos os índices de diversidade genética foram menores nos reprodutores do que na população selvagem. Para explicar este resultado, os autores consideraram a possibilidade desta diferença ser devida aos reprodutores serem oriundos do rio Paraná, enquanto a população selvagem foi amostrada no rio Paranapanema. Adicionalmente, levantam a possibilidade de que práticas inadequadas de manejo e durante a formação dos estoques terem provocado tal perda de diversidade genética (POVH et al., 2008).

Não obstante aos problemas genéticos oriundos das práticas equivocadas nas formações dos estoques e de manejo reprodutivo que podem estar causando a diminuição da variabilidade genética nas proles, são igualmente preocupantes erros evidentes na condução dos programas, relatados por alguns autores. Fica claro o equívoco no manejo quando os autores declaram que o estoque dos reprodutores de *P. mesopotamicus* da estação de piscicultura é formado à partir de indivíduos provenientes do rio Paraná e, no entanto, são utilizados em programas de estocagens no rio Paranapanema (POVH et al., 2008). Outro possível problema levantado por Lopes e colaboradores (2008) é a troca de matrizes entre estações de pisciculturas o que poderia justificar a baixa divergência genética entre dois estoques de origem diferentes, novamente rio Paraná e rio Paranapanema. Estas práticas colocam em risco a estrutura populacional da espécie no ambiente selvagem, que não foi estudada anteriormente à implantação de tais programas de estocagem. Segundo Solé-Cava e Cunha (2012) “[...] se uma espécie ameaçada que ocupa determinada área se apresenta estruturada, então a estratégia de conservação deve procurar preservar a diversidade da espécie em toda sua área de distribuição, pois já podem existir adaptações locais que se perderiam no caso de as populações serem misturadas ou serem extintas”

2.8 Barramentos e Impactos

Segundo o BIG (Banco de Informações de Geração da ANEEL), em 03 de setembro de 2013 havia no Brasil 1.073 empreendimentos de fonte hidrelétrica em operação, 43 em construção e 210 projetos outorgados. Alguns anos mais cedo Agostinho e colaboradores (2005) estimaram haver no Brasil mais de 600 barragens construídas para fins hidrelétricos, totalizando uma área de 40.000 km², um volume de 6,5 x 10¹¹m³. No mundo estima-se que hajam aproximadamente 45.000 grandes barragens e outras 800.000 pequenas, utilizadas entre outros fins, para geração de hidroeletricidade (VÖRÖSMARTY et al., 2006). Podemos observar uma grande concentração de grandes barramentos nos países do hemisfério norte, e nas áreas mais populosas do hemisfério sul (Figura 12).

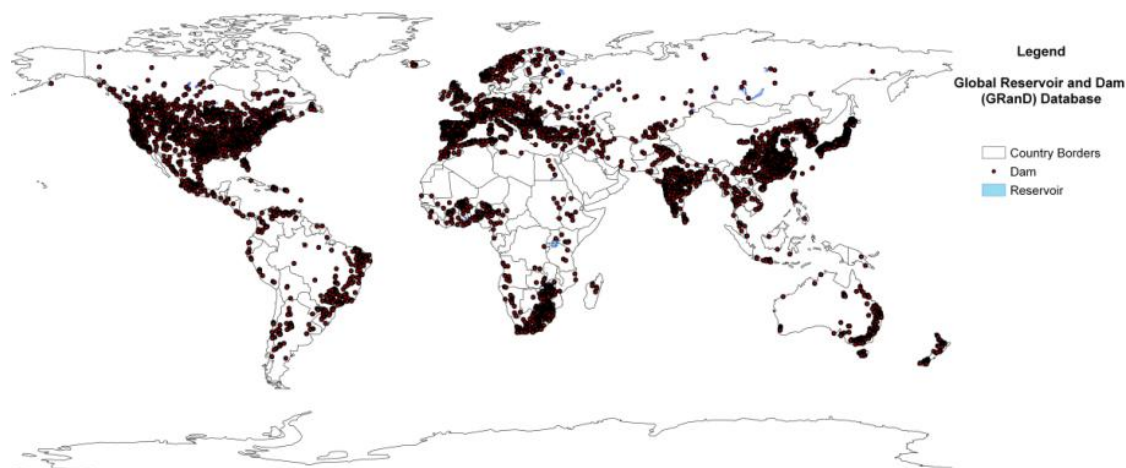


Figura 12 – Localização e principais características dos grandes reservatórios mundiais e barragens com capacidade para acumulação de mais de 0.1km^3 . Esta versão possui 6.862 registros de reservatórios com uma capacidade acumulativa de 6.197km^3 . (FONTE: LEHNER et al., 2008).

A ANEEL adota um sistema de classificação que permite separar as Usinas em três categorias diferentes de acordo com o seu “porte”, sendo elas CGH (Centrais Geradoras Hidrelétricas) com até 1 MW de potência instalada, PCH (Pequenas Centrais Hidrelétricas), com capacidade entre 1,1 e 30 MW e UHE (Usina Hidrelétrica de Energia), com mais de 30 MW (ANEEL, 2008). Ainda, segundo a resolução nº 652, de 9 de dezembro de 2003, as PCHs devem possuir a área do reservatório inferior a $3,0\text{ km}^2$. Atualmente em tributários de menor porte há uma tendência de se construírem PCHs em sucessões formando um sistema em cascata.

A maioria das Usinas Hidrelétricas, no Brasil, localizam-se principalmente nas regiões sul e sudeste, conseqüentemente, duas grandes bacias localizadas nestas regiões a bacia do Paraná e São Francisco possuem boa parte do seu potencial hidrelétrico já utilizado, respectivamente, 72% e 58% (Figuras 13, 14 e 15) (ANEEL, 2008). A bacia do rio Paraná localiza-se na região mais populosa do país, abrigando cerca de 32% da população em apenas 10,5% do território (AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008) e é responsável atualmente pela produção de 70% da hidroeletricidade no Brasil (AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007).

Certamente existem dois equívocos muito grandes quando se trata dos eventuais “benefícios” da hidroeletricidade em relação à outras fontes de energia, principalmente quando se argumenta tratar de uma fonte de “energia limpa” e “renovável”. Sabe-se, que os represamentos podem alterar drasticamente a algumas propriedades físico

químicas da água, promoverem a liberação de gases tóxicos, provocar a eutrofização e a produção excessiva de algas (AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007). Outro problema, é que a vida útil de um reservatório é limitada pela sedimentação que ocorre naturalmente em qualquer reservatório (BERGKAMP et al., 2000), por exemplo, o reservatório da PCH Foz da Anta, planejada para o rio das Cinzas, tem uma vida útil esperada de 46,37 anos (SANTA HELENA ENERGIA, 2012), assim o conceito de fonte de energia renovável também pode ser claramente questionado.

O barramento dos rios e o controle das cheias estão entre os principais fatores que promovem a perda de diversidade em ecossistemas aquáticos continentais no Brasil (AGOSTINHO, THOMAZ e GOMES, 2005). Atualmente, podemos perceber que uma pequena parcela dos grandes sistemas hidrográficos ainda não estão afetados por barramentos (Figuras 12 e 13). Em uma síntese global sobre os impactos de barramentos nos maiores sistemas fluviais observou-se que do total de 292 sistemas avaliados, 104 ou 35,6% estão fortemente afetados, 68 (23,3%) estão moderadamente afetados e os 120 (41,1%) restantes ainda não estão afetados; dentre os dez maiores sistemas fluviais, seis estão moderadamente e quatro fortemente afetados por barramentos (Figura 13) (NILSSON et al., 2005).

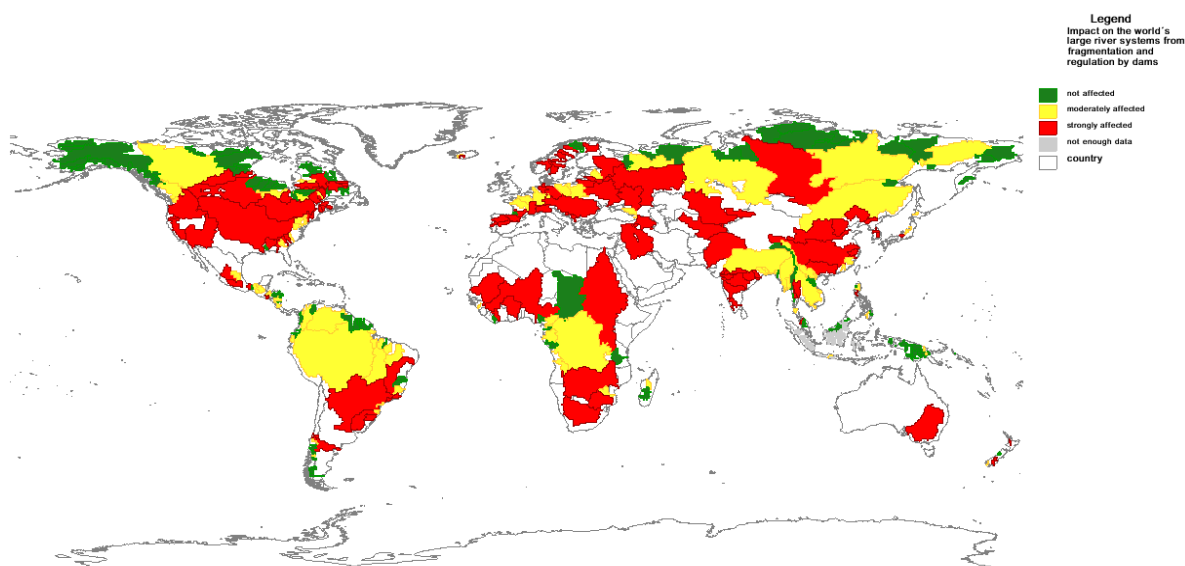


Figura 13 – Nível de impactos por barragens. O mapa mostra os 292 sistemas dos maiores rios classificados em: não afetados, moderadamente afetados e fortemente afetado por barragens. (FONTE: NILSSON et al., 2005).

Um dos principais impactos causados pela construção de uma barragem é a própria barragem, já que ela pode impedir tanto a migração ascendente de espécies de

peixes migradoras, bem como a dispersão descendente de indivíduos jovens, além do que, geneticamente a população pode ser dividida e o acasalamento perturbado alterando seu *pool* gênico. Estes impactos podem ser minimizados caso o reservatório possua um grande afluente ou um conjunto de afluentes menores (PETRERE JR, 1996).

Os impactos relacionados à redução da diversidade de peixes podem ser oriundos diretamente da implantação dos reservatórios, tais como, a destruição de habitats e formação de gradientes de distribuição que podem provocar extinções locais, ou indiretamente, provocados por consequências das barragens ou equívocos no manejo destes reservatórios, tais como, dificuldades e/ou impossibilidades reprodutivas imposta a algumas espécies, redução populacional e limitações de fluxo gênico imposta pela fragmentação do ambiente causada pelos barramentos. Impactos adicionais são causados pela depleção de estoques à jusante, seleção artificial ou *bottleneck* provocado por mecanismos de transposição, e introgressão gênica que pode ser promovida por equívocos de estocagem, finalmente a introdução de espécies exóticas podem ainda atuar e por competição eliminar outras espécies nativas anteriormente presentes. (PETRERE JR, 1996; AGOSTINHO, THOMAZ e GOMES, 2005; AGOSTINHO et al., 2007a, 2007b, 2007c; AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008; LOPES et al., 2008; ORSI, 2010; AGOSTINHO et al., 2012; LORENZEN, BEVERIDGE e MANGEL, 2012).

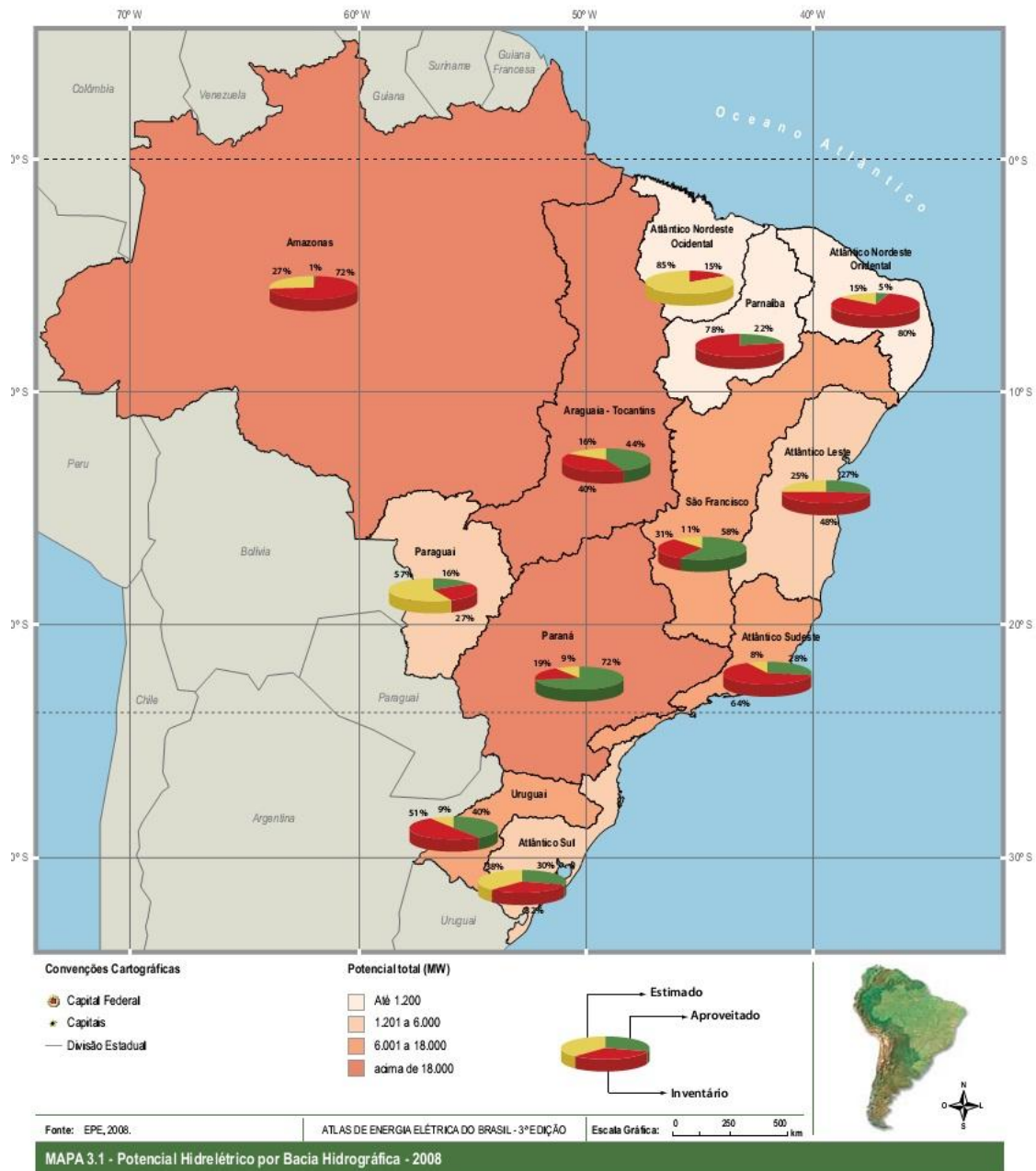


Figura 14 – Potencial hidrelétrico, estimado para o ano de 2008, por bacia hidrográfica, em território brasileiro (FONTE: ANEEL, 2008).



Figura 15 – Potência instalada por estado em 2008. (FONTE: ANEEL, 2008).

Agostinho (1994) sumariza alguns dos impactos que podem ser observados no corpo do reservatório, à sua montante e jusante (Tabela 1). Posteriormente, Agostinho, Pelicice e Gomes (2008) novamente abordam os diferentes impactos que os barramentos podem gerar à montante e à jusante.

Tabela 1 - Impactos potenciais dos reservatórios sobre a ictiofauna. (FONTE: AGOSTINHO, 1994).

Impactos no corpo do reservatório		
Fonte de Impacto	Ação Impactante	Impacto Observado
<i>Redução das áreas sazonalmente alagáveis</i>	<i>Redução nas áreas de desenvolvimento inicial</i>	<i>Redução dos estoques</i>
<i>Alteração na dinâmica da água</i>	<i>Mudança nos atributos físicos, químicos e biológicos</i>	<i>Proliferação de espécies rústicas, geralmente de menor valor comercial. Extinção local de espécies estritamente reofílicas.</i>
<i>Estratificação térmica e química</i>	<i>Depleção do oxigênio Desestratificação</i>	<i>Fuga ou eventualmente mortandade de peixes Eventualmente mortandade de peixes</i>
<i>Alta eutrofização</i>	<i>Deterioração da qualidade da água</i>	<i>Mortandade de peixes</i>
<i>Assoreamento</i>	<i>Restrições à comunidade bentônica</i>	<i>Restrições à alimentação de espécies bentófagas</i>
<i>Instabilidade de nível e ação erosiva das ondas</i>	<i>Restrições à instalação de uma comunidade animal e vegetal</i>	<i>Restrições de abrigos e disponibilidade alimentar para espécies forrageiras e formas jovens Restrições à desova para algumas espécies</i>
<i>Redução na relação área terrestre: área aquática</i>	<i>Menor disponibilidade de alimentos alóctones</i>	<i>Redução nos estoques de espécies frugívoras ou que dependem de suprimento alimentar alóctone</i>
Impactos à Montante		
Fonte de Impacto	Ação Impactante	Impacto Observado
<i>Afogamento de quedas de água</i>	<i>Eliminação de barreiras naturais à dispersão</i>	<i>Introdução de espécies nos segmentos à montante, com os impactos decorrentes</i>
<i>Ampliação da área lacustre da bacia</i>	<i>Proliferação de espécies rústicas de menor interesse à pesca</i>	<i>Dispersão para os trechos à montante reduzindo o interesse à pesca</i>
Impactos à Jusante		
Fonte de Impacto	Ação Impactante	Impacto Observado
<i>Regulação e redução da vazão</i>	<i>Redução na área alagável pela atenuação dos picos de cheias e perda de vazão Retardamento do pico de cheias</i>	<i>Redução dos estoques que dependem da planície alagável para o desenvolvimento inicial Redução dos estoques pela elevação da mortalidade ou sucesso parcial da desova de espécies com ciclo sincronizado a cheia</i>

<i>Retenção de sólidos em suspensão</i>	<i>Maior capacidade carreadora da água evertida e alterações morfológicas e granulométrica no canal</i>	<i>Alterações no habitat relacionadas a abrigo, desova e disponibilidade de alimento bentônico (PETTS, 1984)</i>
	<i>Maior transparência da água</i>	<i>Incremento na mortalidade de jovens por predação</i>
<i>Queda de água no vertedouro ou pressão de turbinas</i>	<i>Super saturação gasosa nas áreas adjacentes à barragem</i>	<i>Mortalidade por embolia gasosa (PETTS, 1984)</i>
	<i>Turbulência hidráulica ou pressão elevadas</i>	<i>Mortandade de peixes</i>
		<i>Incremento na densidade de predadores atraídos por peixes feridos</i>
<i>Atração hidráulica de peixes pelo canal de sucção durante operação de manutenção de turbinas</i>	<i>Concentração de peixes em condições de oxigênio em depleção</i>	<i>Mortandade de peixes por asfixia</i>
<i>Reduções súbitas da vazão à jusante para o enchimento do reservatório ou atender picos de demanda energética</i>	<i>Exposição do leito do rio</i>	<i>Mortandade por asfixia, temperatura ou dessecação</i>
<i>Interceptação do rio pela barragem</i>	<i>Inacessibilidade dos peixes à sua área de reprodução ou alimentação</i>	<i>Redução do estoque com possível inviabilidade da espécie</i>
	<i>Concentração de peixes nas proximidades das barragens</i>	<i>Aumento nos níveis de predação, inclusive pelo homem</i>

Apesar de que nos primeiros meses após o enchimento do reservatório a riqueza de espécies geralmente aumenta devido à mistura de assembleias locais anteriormente distribuídas ao longo de uma série de ecossistemas fluviais que foram, então, homogenizados, um dos efeitos inevitáveis de barramentos são as alterações na composição e abundância da ictiofauna. Este efeito pode gerar a proliferação extrema em algumas populações e a redução ou mesmo extinção de outras. Reduções na diversidade de peixes são esperadas após a fase heterotrófica e principalmente na região lacustre do reservatório propriamente dito. Como a ictiofauna da América do Sul, em geral, não possuem adaptações para ambientes pelágicos (como resultado de sua história evolutiva em ambientes com poucos lagos naturais), as espécies que ocorrem em reservatórios são essencialmente as que ocupam os sistemas fluviais, isto dificulta a

colonização dos grandes reservatórios em algum grau (AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008).

Espacialmente as assembleias de peixes distribuem-se ao longo de um gradiente longitudinal e transversal no reservatório, comumente observa-se o declínio na diversidade de espécies em direção à barragem (AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008). Na represa de Capivara (rio Paranapanema), Hoffmann, Orsi e Shibatta (2005) observaram redução na diversidade de peixes à medida que se aproximavam da zona lacustre, ao contrário, ao se afastarem desta região em direção à ambientes menos influenciados pelo barramento, que apresentavam características mais semelhantes ao ambiente original havia um aumento na diversidade.

Nos reservatórios da bacia do Alto rio Paraná, a ictiofauna é composta basicamente por espécies sedentárias e generalistas (em suas demandas biológicas), tais como ciclídeos, pequenos caracídeos e bagres, além de alguns predadores nativos e não nativos. Estes peixes colonizam as zonas litorâneas, enquanto que as pelágicas e profundas, que apresentam maior área e volume, permanecem praticamente inabitadas. Muitas espécies não conseguem se reproduzir e o recrutamento é afetado em áreas de influências dos reservatórios, pois as espécies geralmente necessitam de habitats particulares e diversos “sinais ambientais” (como temperatura, turbidez e regime hidrológico) para completar os diferentes estágios e processos reprodutivos (como desenvolvimento gonadal, migração, desova, cuidado com juvenis); estas condições estão presentes em áreas fluviais “selvagens”, mas são muito alteradas quando o rio é barrado (AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007; AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008)

Os impactos sobre a ictiofauna da região abaixo da barragem são tão ou mais danosos do que àqueles acima da barragem. Os barramentos afetam primariamente a dinâmica do fluxo de água redistribuindo no espaço e no tempo a vazão do rio, afetando diversos atributos hidrológicos tais como, período de inundação, intensidade, amplitude, duração e frequência e, conseqüentemente, a estrutura, dinâmica e funcionamento dos ecossistemas abaixo da barragem. Além do bloqueio das rotas migratórias de diversas espécies de peixes, e da retenção de sedimentos e nutrientes, o que acarreta a diminuição da turbidez, bem como o carregamento de nutrientes e material em suspensão (AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008).

Os impactos causados pelos barramentos, tais como transformação de ambientes lóticos em lênticos, alterações nos ciclos de inundação, perda de lagoas marginais e fragmentação do ambiente combinados podem causar mudanças na estrutura genética e no tamanho das populações, levando à redução ou mesmo perda de variabilidade genética (GARCEZ, CARCAGNOTTO e ALMEIDA-TOLEDO, 2011).

No Brasil, as ações de manejo tomadas na tentativa de mitigar os impactos causados pelas construções de barragens até os anos 1950 eram focadas em assegurar os movimentos migratórios de peixes por meio da construção de escadas de transposição de peixes, entretanto, estes empreendimentos não funcionaram corretamente principalmente devido a diversas falhas de projeto. Nos anos seguintes o manejo ficou focado no aumento dos estoques pesqueiros por soltura de espécies nativas ou não nativas, e no controle de pesca. Durante este período o manejo procurava a produção e os objetivos relacionados à mitigação dos impactos sobre a diversidade da ictiofauna foram abandonados ou colocados em segundo plano. Na década de 90, novamente os mecanismos de transposição de peixes foram considerados e as espécies nativas passaram a ser prioridades nos programas de estocagem. Uma revisão de um século de atividades de manejo evidencia que as falhas podem ser atribuídas à enfoques reducionistas, técnicas inadequadas, falta de clareza dos objetivos, ausência de monitoramento ou monitoramento inadequado além de deficiências causadas por decisões baseadas em senso comum (AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007; AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008).

Os mecanismos de transposição, quando se objetiva a conservação, deveriam permitir o acesso à locais de reprodução anteriores ao barramento, o livre trânsito de indivíduos entre os trechos à montante e à jusante; pelo menos deveriam permitir o acesso da prole produzida após a desova nas regiões superiores dos rios às partes baixas (AGOSTINHO et al., 2007b). Os mesmos autores documentaram a virtual ausência de movimentos descendentes de espécies migradoras em barramentos, seja de indivíduos adultos, seja de ovos e larvas, pois aparentemente a zona lacustre dos reservatórios formam uma barreira tão importante quanto a própria barragem para a maioria das espécies migradoras, pois devido à transparência da água que aumenta em direção à barragem, ovos e larvas ficam mais susceptíveis à predação; também devido às condições lênticas deste, larvas e principalmente ovos podem sedimentar e se depositar no fundo dos reservatórios, onde as condições de oxigênio são mais precárias.

As regiões lacustres dos reservatórios também são evitadas por indivíduos adultos em relação trechos mais lóticos, geralmente localizados na região mais alta dos reservatórios (AGOSTINHO et al., 2007b; ORSI, 2010), estes aspectos do reservatório, formam, uma barreira muito eficiente para a migração descendente dos indivíduos que alcançaram as áreas de desova à montante das barragens.

Assim, enquanto as barragens propriamente ditas se configuram como um grande obstáculo à migração ascendente, os reservatórios o são para as migrações descendentes de ovos, larvas ou mesmo indivíduos adultos.

Alguns autores vêm documentando e discutindo o fato de que algumas escadas transpõem cardumes de peixes acima da barragem onde não existem ou existem poucos locais que possam servir à desova e crescimento das proles. Soma-se à isto o fato de não haver retorno para áreas abaixo das barragem de ovos, larvas ou adultos, enquanto à jusante da barragem transposta existem áreas no próprio reservatório ou em tributários que oferecem condições para que as espécies possam completar seu ciclo de vida (AGOSTINHO et al., 2007b; LOPES et al., 2007).

Pelicice e Agostinho (2008) caracterizam alguns cenários em que mecanismos de transposição tornarem-se verdadeiras “armadilhas ecológicas”. Estas “armadilhas” podem ser observadas quando: i) o mecanismo é atrativo suficiente para promover a subida dos peixes, ii) a transferência de peixes é predominantemente unidirecional, iii) ambientes acima da barragem devem são pobres em condições para desova e desenvolvimento da prole, iv) existam áreas de desova e desenvolvimento abaixo da barragem. Desta forma, os peixes seriam atraídos de um ambiente rico onde provavelmente completariam seu ciclo de vida, para um ambiente onde isto pode não acontecer, prejudicando o recrutamento inclusive nas áreas à jusante (Figura 16).

Ainda segundo Pelicice e Agostinho (2008), esta situação pode ser indicada pela ausência, ou baixas quantidades, de ovos, larvas e indivíduos jovens em trechos acima da barragem, mesmo quando indivíduos adultos férteis repetidamente chegam à este ambiente; outro indicativo seria a diminuição de adultos e juvenis nos ambientes de boa qualidade abaixo da barragem e um progressivo, mas não permanente aumento da quantidade de peixes nas regiões altas do reservatório.

Também pode ser observado um declínio em um gradiente de ovos e larvas das regiões mais altas do reservatório em direção à barragem, conforme demonstrado por Agostinho et al. (2007b), indicando que os adultos estão se reproduzindo à montante do reservatório, mas os ovos e larvas podem ser perdidos antes de alcançarem as lagoas marginais.

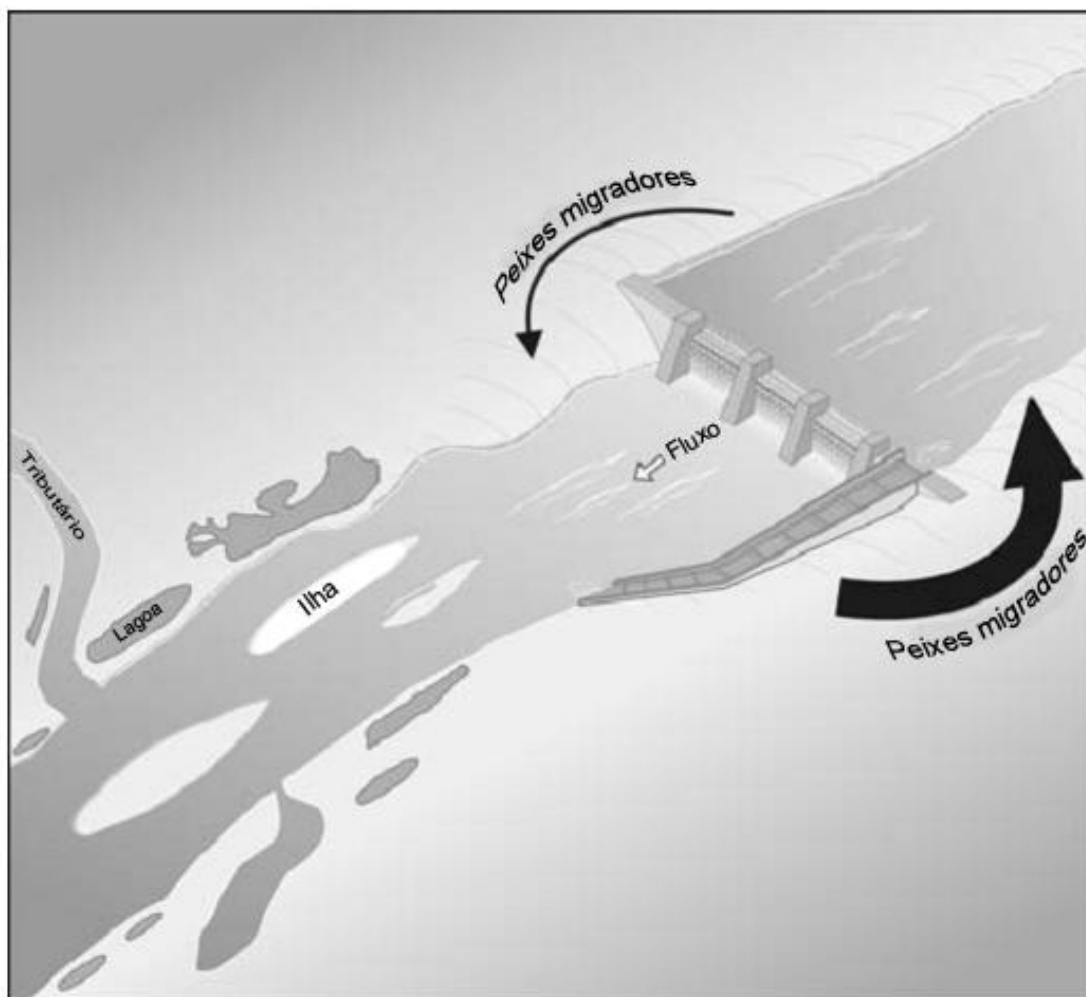


Figura 16 – Esquema de como uma escada de transposição pode funcionar como uma armadilha ecológica. Nota-se à jusante da barragem uma maior riqueza de ambientes onde a espécie migradora poderia completar seu ciclo de vida. Largura das setas indicam a quantidade de fluxo de indivíduos. (Modificado de PELICICE e AGOSTINHO, 2008).

Não restam muitas dúvidas de que os grandes migradores conseguem ascender dos trechos à jusante da barragem para o reservatório, desde que os mecanismos de transposição sejam bem projetados (AGOSTINHO et al., 2007b; AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007). Igualmente, parece não restar dúvidas de que os indivíduos soltos nos reservatórios próximos à barragem consigam continuar a migração

rio acima (ANTÔNIO et al., 2007). Entretanto, ainda existem muitas dúvidas quanto a existência de movimentos descendentes em direção aos trechos à jusante da barragem de ovos, larvas e adultos, que provavelmente ocorrem apenas em situações muito específicas (AGOSTINHO et al., 2007b; AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008; POMPEU et al., 2012).

Os efeitos danosos de “Ecological Traps” ou “Armadilhas Ecológicas” (PELICICE e AGOSTINHO, 2008) vêm preocupando diversos pesquisadores que acreditam que este fato poderia causar a depleção dos estoques à jusante levando ao colapso de todo sistema do médio Paranapanema, onde localizam-se os reservatórios de Capivara, Canoas I e II (PAULA, 2006; LOPES et al., 2007; ORSI, 2010; RAMOS et al., 2012).

Antes da realização de programas de reprodução em cativeiro e soltura de exemplares em populações selvagens é fundamental se conhecer a estrutura genética da espécie ao longo da sua área de abrangência (PADHI, 2013a), a não observância deste aspecto pode levar a falhas nestes programas. Entretanto, merece destaque o fato de que a maioria destes programas não leva em consideração a situação do estoque selvagem, as necessidades e restrições das espécies alvo (AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008).

O risco de perda de diversidade genética associado a programas de estocagem é muito grande quando uma proporção significativa de peixes cultivados contribui de maneira significativa para a “população mista”, mas com um tamanho efetivo muito menor. Isso é possível, pois a grande fecundidade e a alta taxa de sobrevivência das fases iniciais de vida quando cultivados em cativeiro, torna possível a produção de uma grande quantidade de alevinos à partir de um pequeno número de reprodutores (LORENZEN, BEVERIDGE e MANGEL, 2012).

Almeida e colaboradores (2013) alertam para a necessidade de se conhecer a estrutura genética das populações anteriormente à implantação de qualquer programa de estocagem.

O tamanho efetivo (N_e) das populações considera aqueles indivíduos que efetivamente contribuem para a evolução da população, ou seja, aqueles indivíduos que participam da formação da próxima geração. Este tamanho efetivo, leva em

consideração um componente histórico, bem como a proporção de machos e fêmeas e é dado pela fórmula: $N_e = 4N_mN_f/(N_m+N_f)$, onde N_m representa o número de machos e N_f o número de fêmeas (SOLÉ-CAVA e CUNHA, 2012). Apesar deste cálculo ser levado em consideração na formação de estoques com finalidade de repovoamentos em rios e reservatórios, muitas vezes não se utilizam todos os indivíduos do estoque para produzir uma geração de alevinos. Devido à grande fecundidade de várias espécies neotropicais, por exemplo, uma fêmea de *Prochilodus lineatus* pode produzir em média 1.280.000 ovócitos (ORSI, 2010), ou seja, é possível formar um cardume inteiro a partir de poucos indivíduos. Ainda, sabemos que o tamanho efetivo de genes de herança de linhagem materna, tais como os genes mitocondriais, é ainda menor, cerca de 25% dos genes nucleares (WARD, 2002; FREELAND, 2005; McCUSKER e BENTZEN, 2010), esta grande variância no tamanho reprodutivo, quando alguns indivíduos contribuem muito e outros pouco ou nada para a formação da próxima geração, pode levar a extinção de alelos nucleares, e principalmente de linhagens mitocondriais.

Programas de estocagem quando manifestam preocupações genéticas, geralmente preocupam-se apenas com a manutenção da diversidade genética e conseqüentemente prevenção da endogamia, tanto nos estoques de reprodutores como nos juvenis, portanto, em tese, procuram manter estoques mínimos de reprodutores e realizar algum tipo de monitoramento de variabilidade. Nestes casos, a estrutura das populações, biogeografia da espécie quase sempre são ignorados.

Ou seja, para que possamos garantir a eficácia de nossas ações mitigadoras, ou para que possamos fazer recomendações, por exemplo, sobre o desenvolvimento hidrelétrico, transferência de água interbacia e canalização é necessário documentar os movimentos de espécies migratórias chave (ABELL, 2002).

Segundo Abell (2002), os sistemas relativamente não perturbados em nações em desenvolvimento representam a única e passageira oportunidade para uma proteção pró-ativa em larga escala. Por exemplo, em bacias como a do rio Mekong, o qual ainda possui alguns dos maiores corpos d'água com fluxo livre na maior parte de sua extensão, uma estratégia de conservação seria focar esforços imediatos na proteção de rios sem barramentos e suas captações. Seleção de prioridades para proteção poderia se basear em valores relativos de biodiversidade, o que remonta a necessidade de informações sobre espécies e habitats.

Infelizmente a realidade no Brasil é um tanto diferente, pois a comunidade científica é quase sempre ignorada, e seus apontamentos em prol da preservação de determinadas áreas prioritárias não são levados em consideração na grande maioria das situações em que envolve o interesse político e econômico. Como exemplo deste fato, podemos citar os estudos envolvendo as represas de Capivara, Canoas I e II no rio Paranapanema, que já produziram uma quantidade significativa de dados (DIAS et al., 2004; HOFFMANN, ORSI e SHIBATTA, 2005; LOPES et al., 2007; VIANNA e NOGUEIRA, 2008; ORSI, 2010). Neste caso a ação prioritária em prol da conservação da biodiversidade da ictiofauna seria a proteção de seus principais tributários, os rios das Cinzas e Tibagi, conforme apontado por estes diversos autores, foi desconsiderada. Ainda, conforme relatado por Raio e Bennemann (2010), mesmo com a comprovação científica da importância do rio Tibagi para a preservação da biodiversidade do médio Paranapanema, e reprovação dos relatórios e estudos de impactos ambientais por parte da comunidade científica envolvida, em 2012 a UHE Mauá iniciou sua geração comercial (CRUZEIRO DO SUL, 2013).

Segundo dados e planejamento da Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL (2008), a matriz energética brasileira deve continuar fundamentada sobre a hidroeletricidade, atualmente com uma potência instalada de aproximadamente 75.000MW a hidroeletricidade responde 75,68% de todo potencial instalado no país de 102,262 mil MW. De acordo com o Plano Nacional de Energia 2030, pretende-se alcançar a meta de 126.000MW de hidroeletricidade, sendo que as bacias mais visadas para atingir esta meta são Amazonas e do Tocantins/Araguaia. Neste cenário aparentemente irreversível, os biólogos poderiam fazer recomendações para localização dos projetos, onde eles trariam menores danos (ABELL, 2002), no entanto diante dos acontecimentos relatados para a UHE Mauá, é pouco provável que isto venha a se concretizar.

No momento em que há um plano por parte do governo para a ampliação da geração de hidroeletricidade é preciso se atentar ao fato de que a unidade de gestão dos recursos hídricos é a bacia hidrográfica, como pode ser visto na legislação vigente: a Lei 9433/97 – Plano Nacional de Recursos Hídricos em seu art. 1º inciso V estabelece que:

“a bacia hidrográfica é a unidade territorial para implementação da Política Nacional de Recursos Hídricos e atuação do Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos”,

Assim como a Lei 8.171/91 – Política Agrícola em seu artigo 20 também aponta que:

“As bacias hidrográficas constituem-se em unidades básicas de planejamento do uso, da conservação e da recuperação dos recursos naturais”.

Ainda a Lei 8.171/91 em seu artigo 23 responsabiliza as empresas pela alterações ambientais e possíveis recuperações na área de abrangência das bacias hidrográficas:

“As empresas que exploram economicamente águas represadas e as concessionárias de energia elétrica serão responsáveis pelas alterações ambientais por elas provocadas e obrigadas a recuperação do meio ambiente, na área de abrangência de suas respectivas bacias hidrográficas”

Com a legislação vigente extremamente clara quanto a unidade de gestão dos recurso hídricos e em se tratando de ambiente aquático não se pode almejar a preservação de um ponto de maneira isolada, pois uma determinada área é influenciada por regiões à montante, à jusante e por toda circunvizinhança (DUDGEON et al., 2006; LÉVÊQUE et al., 2008), de maneira recíproca, os impactos de um barramento influenciam não apenas o local do empreendimento, ou do reservatório, mas impacta também áreas tanto à montante como à jusante (AGOSTINHO, PELICICE e GOMES, 2008), além do que quando vários reservatórios são construídos num mesmo rio, estes podem apresentar um efeito cumulativo, promovendo drásticas reduções sobre a ictiofauna (AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007). Desta forma, parece inconcebível que para a elaboração de Estudos e Relatórios de Impactos Ambientais, e para a emissão de licenças e autorizações aceitem-se estudos pontuais que avaliam uma área extremamente restrita dentro de uma bacia. Ainda, quando existem várias barragens em um mesmo rio não leva-se em consideração a ação impactante do conjunto, mas sim de um empreendimento isolado. Fica evidente aqui, um dos maiores desrespeitos à legislação ambiental vigente cometidos atualmente. Os efeitos de um barramento, para espécies que podem migrar mais de 1.000 km para se reproduzir

podem causar prejuízos à biodiversidade em bacias vizinhas, em estados vizinhos ou mesmo países vizinhos.

Habitats dos peixes são destruídos como consequência de diversos fatores. Regiões de cabeceiras têm sido alteradas por desflorestamento e erosão na bacia hidrográfica, e consequentes assoreamentos têm destruído locais de reprodução de muitas espécies que necessitam de água clara e rica em oxigênio. Escoamentos de produtos agrícolas como pesticidas e fertilizantes, esgoto e poluentes químicos são um estresse adicional para populações remanescentes de peixes. Empreendimentos para retenção de água e geração de eletricidade criam barreiras às rotas naturais de dispersão de peixes migradores e eliminam oportunidades para o fluxo gênico entre populações de peixes de água doce do grupo primário (VRIJENHOEK, 1998).

Desta maneira é de extrema importância documentar a biodiversidade presente em cada ecossistema, em especial os de água doce que comprovadamente encontram-se sob forte ameaça em todo mundo. Então, teremos dado o primeiro passo de uma longa caminhada em direção à preservação efetiva da vida em todo planeta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- Registrar a diversidade de peixes presente no rio Laranjinha desde o nível específico até o nível molecular, como subsídio tanto para programas de preservação e conservação da área, como para decisões acerca desta bacia.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar um inventário da ictiofauna presente no rio Laranjinha;
- Elencar espécies que viabilizem a realização de análises genéticas, tais como espécies migradoras, não migradora e ameaçadas;
- Caso necessário, desenvolver e caracterizar iniciadores para lócus de microssatélite para uma espécie amplamente distribuída pela bacia do rio Paranapanema;
- Realizar um registro por meio de marcadores moleculares da diversidade genética de uma espécie não migradora ao longo do rio Laranjinha;
- Realizar a análise da diversidade e estrutura genética de uma espécie migradora presente no rio Laranjinha e na represa de Capivara – rio Paranapanema;
- Diagnosticar a diversidade genética de uma espécie ameaçada de extinção presente no rio Laranjiha;
- Montar um banco de tecidos que preservem, como registro histórico, a diversidade genética das espécies de peixes presentes no rio Laranjinha entre os anos de 2010 e 2012;

4 TRABALHOS

4.1 Capítulo 1

PEIXES DO RIO LARANJINHA, BACIA DO ALTO RIO PARANÁ, PARANÁ, BRASIL

Este trabalho será submetido à revista *Check List*

Peixes do rio Laranjinha, bacia do Alto rio Paraná, Paraná, Brasil

RESUMO

Este é o primeiro levantamento abrangente de peixes do rio Laranjinha, afluente do rio das Cinzas, bacia do rio Paranapanema, um dos poucos afluentes remanescentes do baixo Paranapanema que possuem trechos livres. Nove locais fixos de coleta foram amostrados por seis vezes ao longo das estações entre os anos de 2010 e 2012 com o auxílio de redes de espera, tarrafas e peneiras. No total foram capturados 11.924 indivíduos representados por sete ordens, 25 famílias e 103 espécies, coletados com peneira, tarrafa e rede de espera. Entre os peixes coletados, *Brycon orbygnianus*, *Brycon nattereri*, *Rhinelepis aspera* e *Salminus brasiliensis* estão ameaçadas de extinção, e *Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus*, *Sorubim lima* e *Hyphessobrycon eques* foram introduzidos. A ocorrência de várias espécies migradoras capturadas no seu leito, como *Brycon orbygnianus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Pinirampus pirinampu*, *Prochilodus lineatus*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Rhinelepis aspera*, *Salminus brasiliensis*, *Salminus hilarii*, entre outros, pode ressaltar a importância desse afluente para tais espécies.

Palavras-chave: levantamento da ictiofauna, diversidade de peixes, rio Laranjinha, Peixes neotropicais.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se que existam aproximadamente 28.000 espécies de peixes em todo mundo, destas, mais de 12.000 espécies são peixes de água doce (Balian et al., 2008; Lévêque *et al.*, 2008; Hickman Jr. et al., 2013). No Brasil, particularmente, o número de espécies de peixes de água doce gira em torno de 2.587 (Buckup et al., 2007). A bacia do Alto rio Paraná, que é provavelmente uma das drenagens mais estudadas do Brasil, contabilizam-se cerca de 310 espécies, um número sabidamente subestimado, já que existem dezenas de espécies novas aguardando descrição (Langeani et al., 2007). Particularmente no sistema do Alto Paraná, ainda existem muitas drenagens não inventariadas, o que inclui corpos d'água de menor porte (Galves et al., 2009) sabidamente detentores de uma parcela significativa da diversidade, tendo em vistas o grande número de espécies novas encontradas nestes ambientes (Castro et al., 2003, 2004; Langeani et al., 2007). Segundo Langeani et al., (2007) há uma grande concentração de trabalhos no Alto rio Paraná no Estado de São Paulo, e apesar de ser pertinente a manutenção de esforços de coleta neste estado, é necessário aumentar os esforços em áreas menos amostradas como nos estados do Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais.

O grande número de bacias hidrográficas que ainda não foram suficientemente inventariadas, o que impossibilita a determinação exata do número de espécies nos ecossistemas continentais brasileiros (Agostinho et al., 2005), o que certamente dificulta o delineamento de estratégias de conservação adequada e tornam incertas as decisões que afetam o ecossistema aquático.

Um levantamento abrangente de peixes no rio Laranjinha ainda é inédito, embora exista uma publicação de um dos seus afluentes, o ribeirão Penacho (Costa et al., 2013). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo realizar um inventário abrangente da ictiofauna da bacia, avaliar sua composição e indicar as espécies introduzidas, migradoras e as ameaçadas de extinção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O rio Laranjinha, localizado totalmente no nordeste do estado do Paraná, é o principal afluente da margem esquerda do rio das Cinzas, tributário da margem esquerda do médio rio Paranapanema (Figura 1 e 2). Sua foz encontra-se a 4 km da cidade de Itambaracá (23°01'03.51"S 50°24'22.68"O) na elevação de 348 m acima do nível do mar e sua nascente encontra-se próxima à cidade de Ventania (24°14'43.43"S 50°14'32.78"O) na altitude de 984m. O rio Laranjinha, com seus meandros, possui extensão de 350 km e está localizado na bacia sedimentar do Paraná; sua nascente e foz localizam-se no segundo e terceiro planaltos paranaenses, respectivamente (Santos et al., 2006). Entre os anos 1956 e 1960 uma pequena central hidrelétrica (PCH), que jamais entrou em operação, foi construída a 98 km de sua foz, e recentemente, em 2006, foi construída uma escada de transposição (Schwartz, 2006) (Figura 2 G).

2.2 Coleta de dados

Foram demarcados nove locais de coleta distribuídos desde sua nascente até sua foz (Figura 01 e 02; Tabela 1), em cada local foram realizadas seis coletas no período de outubro de 2010 a abril de 2012 sob a autorização 23315-1/SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade/Ministério do Meio Ambiente). Os trechos A e B, pela proximidade com a nascente, possuíam características semelhantes a um riacho, portando, foram utilizadas apenas duas peneiras (1,38 m²) em um trecho com 300 m de comprimento, delimitado por redes com malha de 2 mm, e esforço de coleta de quatro pessoas durante 1 h 30 min. No trecho C, com característica intermediária, foram utilizadas 270 m² de redes de espera com malhas variando de 1 a 3 cm de entrenós opostos com vistorias ao entardecer e ao amanhecer, duas peneiras (1,38 m²) em um trecho com 300 m de comprimento e esforço de coleta de quatro pessoas durante 1 h 30 min e uma tarrafa com 3 cm de entrenós opostos (10 lançamentos). Por fim, nos trechos de D a I foram utilizados 720 m² de redes de espera com malhas variando de 1 a 8 cm de entrenós, com vistorias ao entardecer e ao amanhecer, além da pesca com duas peneiras (1,38 m²) com um esforço de coleta de quatro pessoas durante 40 min e 10 lances de tarrafa (3 cm de entrenós).

Depois de coletados, os peixes foram trazidos em gelo ao Laboratório de Genética e Conservação da Universidade Estadual do Norte do Paraná (GECON / UENP-CCP), para retirada de uma amostra de musculatura para compor a coleção de tecidos do GECON e armazenada em etanol 95% a -20°C. Os exemplares foram então fixados em solução de formalina a 10%, posteriormente transferidos para etanol a 70% e identificados de acordo com a literatura específica. Exemplares testemunhos foram depositados na Coleção Ictiológica da Universidade Estadual do Norte do Paraná (CIUENP) e no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL).

A riqueza de espécies e frequência de captura de cada espécie foram calculadas em relação ao total de indivíduos coletados.

Para complementar a lista de espécies foram utilizados registro de captura pertencentes à outros projetos de nosso grupo de trabalho, bem como dados publicados por Costa *et al.* (2013).

Tabela 1 - Descrição dos locais amostrados no rio Laranjinha, afluente do rio Paranapanema, Paraná.

Ponto	Localidade	Município	Coordenada	Descrição do Ambiente
A	Pedreira	Ventania	24°15'8.55"S / 50°12'1.35"O	Ponto mais distante da foz; largura média de 4m; substrato alternando entre areia e lajes.
B	Cachoeira	Ventania	24°14'37.57"S / 50°12'24.48"O	Substrato alternando entre grandes rochas e areia; largura média aproximada de 4m; oito quilômetros acima recebe grande carga de efluentes domésticos.
C	SANEPAR	Ventania	24°13'24.56"S / 50°11'57.88"O	Fundo de sedimento argiloso; grande perturbação antrópica pela presença de uma ponte e estrada rural; largura média aproximada de 5 m.
D	Distrito da Moquéim	Ventania	24°01'36.6"S / 50°11'21.6"O	Inserido em uma propriedade privada para plantio de árvores para extração de madeira. Trecho localizado entre uma pequena cachoeira e uma corredeira formando um lago com largura média aproximada de 13 m, paredões rochosos e fundo predominantemente arenoso.
E	Figueira	Figueira	23°51'34.73"S / 50°22'43.04"O	Ausência de vegetação ripária em ambas as margens, onde há predominância de gramíneas; substrato alternando entre rochas e areia; largura média aproximada de 14m. No local há extração de areia e à jusante deste ponto existe uma pequena barragem que serve a uma usina termelétrica.
F	Ibaiti	Ibaiti	23°43'31.88"S / 50°26'34.42"O	Largura média aproximada de 40m. Trecho localizado à montante da área próxima à uma destilaria de álcool.
G	Barragem da Corredeira	Ribeirão do Pinhal	23°17'49.95"S / 50°28'43.27"O	Possui vegetação ciliar em ambas as margens, alternando trechos bem preservados com trechos mal preservados com predominância de gramíneas. No meio deste trecho de coleta existe um barramento que possui uma escada de transposição, à montante da barragem forma um lago com largura média aproximada de 63m com substrato arenoso, à jusante, possui águas rápidas, com largura média de 48m, substrato predominantemente rochoso, alterna corredeira com poços mais profundos
H	Santa Amélia	Santa Amélia	23°24'53.06"S / 50°27'8.60"O	Fundo predominantemente rochoso, apresenta largura média aproximada de 55m, ponto de coleta delimitado à montante por uma grande corredeira
I	Foz	Bandeirantes	23°1'53.90 S / 50°26'51.90"O	Trecho delimitado à jusante pela foz do rio Laranjinha no rio das Cinzas, trecho com largura média aproximada de 48m, substrato predominantemente arenoso; possui algumas corredeiras na parte média do ponto, entretanto predominam águas calmas.

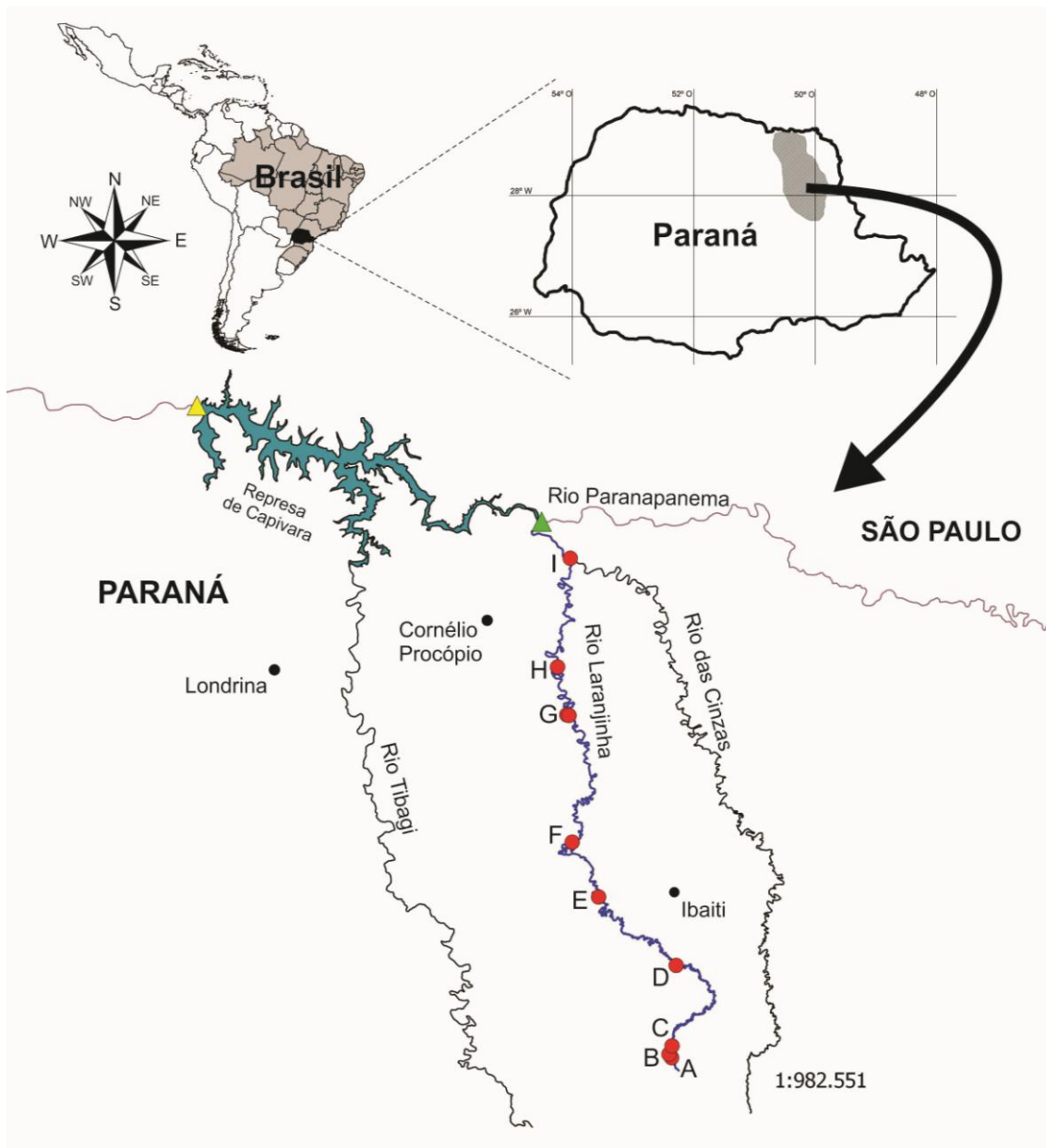


Figura 1 – Mapa dos pontos amostrados ao longo do rio Laranjinha. Círculos em vermelho representam os locais de coleta. Triângulo amarelo representa UHE Capivara e o triângulo verde representa UHE Canoas I, ambas no rio Paranapanema.



Figura 2 – Vista parcial dos pontos de coleta ao longo do rio Laranjinha ilustrando os ambientes e a vegetação marginal. Pontos próximos a nascentes (a-c), pontos na porção média rio Laranjinha (d-f) e locais próximo a foz (g-i).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rio Laranjinha vem sendo alvo de diversos projetos para implantação de PCHs apesar de diversos estudos apontarem para sua importância ecológica (Lopes et al., 2007; Vianna & Nogueira, 2008; Orsi, 2010). Entretanto, o primeiro passo para se conservar a biodiversidade de uma área é a realização de um inventário para se conhecer as espécies que a habitam (Simic et al., 2007).

Foram coletados 11,924 espécimes representados por 103 espécies, sete ordens e 25 famílias (Tabela 2 e Anexo 1). Das espécies coletadas, 44,6% são Siluriformes, 39,6% Characiformes, 6,9% Gymnotiformes, 5,9% Perciformes, as ordens Cyprinodontiformes, Synbranchiformes e Cypriniformes foram representados por apenas uma espécie. Na drenagem do rio Laranjinha, 84,4% da ictiofauna pertencem aos Siluriformes e Characiformes, essa dominância está de acordo com outros estudos similares na região Neotropical (e.g. Castro & Casatti, 1997; Sabino & Zuanon, 1998;

Lowe-McConnell, 1999; Queiroz et al., 2013), no sistema do Alto rio Paraná (Agostinho & Julio-Junior, 1999; Langeani et al., 2007), e na bacia do rio Paranapanema (Carvalho et al., 1998; Hoffmann et al., 2005; Britto & Carvalho, 2006; Shibatta et al., 2007).

Tabela 2 - Lista de espécies capturadas ao longo do rio Laranjinha (locais A a I, ver Figuras 1 e 2, e Tabela 1 para a localização e caracterização), Paraná, Brasil e suas respectivas abundância de captura. ♠ espécie não nativa de acordo com Graça & Pavanelli (2007), Langeani et al. (2007), Júlio Jr et al. (2009) e Orsi comunicação pessoal. ♦ espécie adicionais registrada na bacia por Costa et al. (2013).

Táxon	Trechos Amostrados									Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
CHARACIFORMES										
Acestrorhynchidae										
<i>Acestrorhynchus lacustris</i> (Lütken 1875)							56	38	61	155
Anostomidae										
<i>Leporellus vittatus</i> (Valenciennes 1850)							2	2		4
<i>Leporinus amblyrhynchus</i> Garavello & Britski 1987				20	23	9	43	11	15	121
<i>Leporinus friderici</i> (Bloch 1794)							3	9	43	55
<i>Leporinus obtusidens</i> (Valenciennes 1837)							10	1	7	18
<i>Leporinus octofasciatus</i> Steindachner 1915				5	3	12	10		16	46
<i>Leporinus striatus</i> Kner 1858						15		17	10	42
<i>Schizodon intermedius</i> Garavello & Britski 1990					4	1		1	79	85
<i>Schizodon nasutus</i> Kner 1858					25	29	49	2	16	121
Characidae										
<i>Aphyocharax cf. dentatus</i> Eigenmann & Kennedy, 1903 ♠									1	1
<i>Astyanax altiparanae</i> Garutti & Britski, 2000			1	18	42	96	242	106	134	639
<i>Astyanax bockmanni</i> Vari & Castro 2007			1	36	70	7	4	21	17	156
<i>Astyanax cf. paranae</i> Eigenmann 1914	571	134	70	14	9	22	2	1		823
<i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier, 1819)				201	9	11	86	11	14	332
<i>Brycon nattereri</i> Günther 1864				82	5					87
<i>Brycon orbygnianus</i> (Valenciennes 1850)							50			50
<i>Bryconamericus iheringii</i> (Boulenger 1887)				13	112	19	18	98		260
<i>Bryconamericus stramineus</i> Eigenmann 1908					2	4	2	15		23
<i>Cheirodon stenodon</i> Eigenmann 1915					26	48				74
<i>Galeocharax knerii</i> (Steindachner 1879)							118	42	43	203
<i>Hyphessobrycon eques</i> (Steindachner 1882) ♠									12	12
<i>Moenkhausia intermedia</i> Eigenmann 1908									157	157
<i>Odontostilbe</i> sp.					7	3				10
<i>Oligosarcus paranensis</i> Menezes & Géry 1983				45	13	18				76
<i>Piabina argentea</i> Reinhardt 1867							2	5		7
<i>Salminus brasiliensis</i> (Cuvier 1816)								1		1
<i>Salminus hilarii</i> Valenciennes 1850							1			1
<i>Serrapinnus notomelas</i> (Eigenmann 1915)							2			2
<i>Triportheus nematurus</i> (Kner 1858) ♠								1	43	44

Crenuchidae

Characidium aff. *zebra* Eigenmann 1909 4 19 1 24

Curimatidae

Cyphocharax modestus (Fernández-Yépez 1948) 27 4 75 1 1 17 125

Steindachnerina insculpta (Fernández-Yépez 1948) 2 12 109 12 37 172

Erythrinidae

Hoplias malabaricus (Bloch 1794) 1 6 17 62 6 2 29 123

Parodontidae

Apareiodon ibitiensis Campos, 1944 1 4 1 10 2 18

Apareiodon piracicabae (Eigenmann, 1907) 35 45 44 91 79 143 437

Parodon nasus Kner 1859 25 2 27

Prochilodontidae

Prochilodus lineatus (Valenciennes 1837) 120 40 29 4 4 197

Serrasalminidae

Metynnis maculatus (Kner 1858)▲ 1 6 7

Piaractus mesopotamicus (Holmberg 1887) 3 6 9

Serrasalmus maculatus Kner 1858 32 1 14 47

CYPRINIDONTIFORMES**Poeciliidae**

Phalloceros harpagos Lucinda 2008 278 1043 27 3 1351

Poecilia reticulata Peters 1859▲◆

CYPRINIFORMES**Cyprinidae**

Cyprinus carpio Linnaeus 1758▲ 2 2

GYMNOTIFORMES**Apteronotidae**

Apteronotus aff. *albifrons* (Linnaeus, 1766)▲ 1 1

Apteronotus cf. *caudimaculosus* Santana, 2003▲ 3 3

Apteronotus sp. 1 1

Gymnotidae

Gymnotus sp. ◆

Gymnotus sylvius Albert & Fernandes-Matioli 1999 2 1 10 9 4 7 33

Sternopygidae

Eigenmannia trilineata López & Castello 1966 3 2 4 3 11 23

Sternopygus macrurus (Bloch & Schneider 1801) 1 5 3 9

PERCIFORMES**Cichlidae**

Australoheros sp. 1 1

Crenicichla britskii Kullander 1982 4 9 13

Crenicichla jaguarensis Haseman 1911 7 8 22 37

Crenicichla jupiaensis Britski & Luengo 1968▲ 1 1

Geophagus brasiliensis (Quoy & Gaimard 1824) 11 182 238 183 3 10 627

Oreochromis niloticus (Linnaeus 1758)▲ 2 1 3 7 1 14

SILURIFORMES

Aspredinidae

Bunocephalus larai Ihering 1930 3 1 4

Auchenipteridae

Ageneiosus militaris Valenciennes 1835 ♣ 1 1

Glanidium cesarpintoi Ihering, 1928 1 1

Tatia neivai (Ihering 1930) 1 1 3 11 2 18

Callichthyidae

Callichthys callichthys (Linnaeus 1758) 1 1

Corydoras aeneus (Gill 1858) 1 1

Hoplosternum littorale (Hancock 1828) ♣ 3 3

Doradidae

Rhinodoras dorbignyi (Kner 1855) 13 13

Heptapteridae

Cetopsorhamdia iheringi Schubart & Gomes 1959 3 3

Imparfinis mirini Haseman 1911 1 2 13 3 1 20

Imparfinis schubarti (Gomes, 1956) ♦

Phenacorhamdia tenebrosa (Schubart 1964) 2 2

Pimelodella meeki Eigenmann 1910 1 3 8 12

Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard 1824) 36 5 4 3 4 2 14 68

Loricariidae

Ancistrus cf. cirrhosus (Valenciennes 1836) 4 3 2 9

Hisonotus insperatus Britski & Garavello 2003 45 45

Hypostomus albopunctatus (Regan 1908) 11 1 88 19 119

Hypostomus ancistroides (Ihering 1911) 299 305 232 140 113 30 51 1170

Hypostomus cf. paulinus (Ihering 1905) 6 246 91 86 194 244 141 1008

Hypostomus cf. topavae (Godoy 1969) 1 1 1 40 32 74 56 205

Hypostomus hermanni (Ihering 1905) 73 166 162 401

Hypostomus iheringii (Regan 1908) 2 13 15

Hypostomus nigromaculatus (Schubart 1964) 29 5 6 9 9 7 65

Hypostomus regani (Ihering 1905) 11 5 5 21

Hypostomus strigaticeps (Regan 1908) 267 77 93 210 119 36 802

Loricaria prolixa Isbrücker & Nijssen, 1978 22 15 37

Loricaria sp. 1 3 16 20

Loricariichthys platymetopon Isbrücker & Nijssen 1979 ♣ 10 38 48

Megalancistrus parananus (Peters 1881) 5 5 10

Neoplecostomus yapo Zawadzki, Pavanelli & Langeani 2008 35 29 5 2 71

Otothyropsis biannicus Calegari, Lehmann A. & Reis 2013 23 2 25

Pterygoplichthys ambrosettii (Holmberg 1893) ♣ 1 7 8

Rhinelepis aspera Spix & Agassiz 1829 12 12

Rineloricaria latirostris (Boulenger 1900) 3 2 2 1 8

Rineloricaria pentamaculata Langeani & de Araujo 1994 1 1 2 4

Pimelodidae

Iheringichthys labrosus (Lütken 1874) 4 16 37 24 16 44 141

Megalonema platanum (Günther 1880) 5 5

<i>Pimelodus maculatus</i> Lacépède 1803	1						14	8	28	51	
<i>Pimelodus microstoma</i> Steindachner 1877	57	6	9				103	39	7	221	
<i>Pimelodus paranaensis</i> Britski & Langeani 1988							8	2		10	
<i>Pinirampus pirinampu</i> (Spix & Agassiz 1829)									4	4	
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Spix & Agassiz 1829)									1	1	
<i>Sorubim lima</i> (Bloch & Schneider 1801)♣									3	3	
Pseudopimilodidae											
<i>Pseudopimelodus pulcher</i> (Boulenger 1887)									115	115	
Trichomycteridae											
<i>Trichomycterus diabolus</i> Bockmann, Casatti & de Pinna 2004	26	169	8	9	3					215	
<i>Trichomycterus davisi</i> (Haseman 1911)♦											
SYNBRANCHIFORMES											
Synbranchidae											
<i>Synbranchus marmoratus</i> Bloch 1795									1	1	
Total		912	334	1486	1655	1296	1158	2082	1326	1675	11924

A maior parte dos estudos ictiofaunísticos no Estado do Paraná estão relacionados a pequenos corpos d'água como riachos (Pavanelli & Caramaschi, 1997; Gubiani et al., 2006; Shibatta et al., 2006; Galves et al., 2007; Maier et al., 2008; Gubiani et al., 2010; Cionek et al., 2012; Costa et al., 2013). Trabalhos cujos levantamentos consistem de amostragens ao longo de uma drenagem de grande porte, como rios, são escassos e resumem em três obras, uma para o rio Tibagi no qual foram inventariados 110 espécies (Shibatta et al., 2002), uma para o rio Iguaçu, no qual foram registradas 106 espécies (Baumgartner et al., 2012) e ainda uma para a planície de inundação do Alto rio Paraná na qual foram coletadas 182 espécies diferentes (Graça & Pavanelli, 2007). Ainda existem alguns levantamentos realizados em reservatórios do rio Paranapanema, tais como Capivara com 67 espécies (Hoffmann et al., 2005) e Taquaruçu com 73 espécies (Britto & Carvalho, 2006). Embora o número de 103 espécies capturadas no rio Laranjinha, seja representativo, por se tratar de uma drenagem pouco estudada historicamente, é possível que o número de espécies aumente, conforme novos esforços sejam realizados.

Neste trabalho, as famílias com maior o número de espécies foram Loricariidae (20,8%), Characidae (19,8%), Pimelodidae (7,9%), Anostomidae (7,9%) e Heptapteridae (5,9%). Characidae e Loricariidae são a quarta e a quinta famílias com o maior número de espécies do mundo (Nelson, 2006). Characidae com cerca de 1000 espécies (Mirande, 2009) e Loricariidae cerca de 800 espécies (Ferraris, 2007). Essas

duas famílias foram representados por 41 espécies, ou 40,6% do total da riqueza encontrada.

As localidades A e B apresentaram as menores riquezas de espécies (cinco espécies em cada), enquanto que a localidade I apresentou o maior número de espécies (65 espécies). Estes trechos representam a nascente e a foz do rio Laranjinha respectivamente, padrão condizente com a teoria do rio contínuo de Vanotte et al. (1980).

As espécies mais abundantes foram *Phalloceros harpagos* (11,2%), *Hypostomus* cf. *paulinus* (9,7%), *Astyanax* cf. *paranae* (7,2%), *Hypostomus strigaticeps* (6,7%) e *Astyanax altiparanae* (5,3%).

Espécies possivelmente novas são *Odontostilbe* sp., *Loricaria* sp. e *Apteronotus* sp. Oito espécies estão com sua taxonomia incerta *Aphyocharax* cf. *dentatus*, *Astyanax* cf. *paranae*, *Characidium* aff. *zebra*, *Apteronotus* aff. *albifrons*, *Apteronotus* aff. *caudomaculosus*, *Australoheros* sp., *Ancistrus* cf. *cirrhosus*, *Hypostomus* cf. *paulinus* e *Hypostomus* cf. *topavae*

Quanto a origem das espécies capturadas, 14,6% não são nativas, duas são provenientes de outro continente, a carpa *Cyprinus carpio* originária da Ásia (Graça & Pavaneli, 2007) e a tilápia *Oreochromis niloticus* da África (Graça & Pavaneli, 2007), as demais espécies pertencem à outras localidades no continente sul-americano e também foram introduzidas na bacia devido à alguma atividade antrópica. Para elencar as espécies como não nativas foi realizada uma análise comparativa dos levantamentos de Graça & Pavaneli (2007), Langeani et al. (2007), Júlio Jr et al. (2009) e Orsi (comunicação pessoal) (Tabela 2).

Agostinho et al. (2003) listam a ocorrência de 16 espécies migradoras de longas distâncias do Alto rio Paraná, das quais 10 foram capturadas no rio Laranjinha: *Brycon orbygnianus*, *Leporinus obtusidens*, *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Rhinelepis aspera*, *Salminus brasiliensis*, *Salminus hilarii*, *Pimelodus maculatus* e *Sorubim lima*. Adicionalmente, as espécies *Leporinus friderici*, *Schizodon nasutus*, *Megalonema platanus*, *Rhamdia quelen* e *Pinirampus pirinampu* capturadas neste estudo, também realizam migrações, como mencionado por Agostinho et al. (2007), totalizando 15 espécies migradoras presentes no rio Laranjinha.

Vianna & Nogueira (2008) estudando a dinâmica de ovos e larvas no rio das Cinzas encontraram que os peixes do médio rio Paranapanema utilizam esse afluente para desovar. Sendo o Laranjinha um afluente do rio das Cinzas, é possível que a

ocorrência de peixes migradores esteja relacionada à presença de trechos livres e caudalosos, no qual as espécies mencionadas acima podem realizar migrações e completar seus ciclos reprodutivos. Conseqüentemente, o rio Laranjinha também pode ser um importante contribuinte para a manutenção da diversidade e de populações viáveis do médio Paranapanema. Outros autores também destacam a bacia do rio das Cinzas, e portanto o rio Laranjinha, como provável rota migratória de peixes oriundos da represa de Capivara (Dias et al., 2004; Hoffmann et al., 2005; Paula, 2006; Lopes et al., 2007; Vianna & Nogueira, 2008; Orsi, 2010)

A fragmentação e a perda dos habitats naturais é a maior ameaça à diversidade biológica (Wilcove et al., 1998). Nos sistemas aquáticos uma das principais ameaças à biodiversidade dos ambientes de água doce é a construção de barramentos associadas à produção de hidroeletricidade (Agostinho et al., 2005; Dudgeon, et al., 2006; Agostinho et al., 2008). Neste contexto, uma das bacias mais afetadas por barramentos no Brasil é a do rio Paraná (Agostinho et al., 2008), e mais especificamente um de seus afluentes, o rio Paranapanema, tornou-se um ambiente altamente impactado pela implantação de várias usinas hidrelétricas, que transformaram-se numa sucessão de lagos artificiais (Agostinho & Julio-Junior, 1999). Uma vez que as rotas migratórias são afetadas pelo barramento do rio, não apenas a fauna local poderá ser prejudicada, mas também as populações de peixes que utilizam esse afluente para completar seus ciclos reprodutivos.

A presença de trechos livres no rio Laranjinha tem despertado o interesse do setor energético, atualmente com diversos projetos para implantação de PCHs no seu leito (ANEEL, 2013). Este fato é preocupante e torna as informações levantadas aqui, essenciais para subsidiar tomadas de decisões voltadas à conservação da ictiofauna.

A preservação do rio Laranjinha é de extrema importância, pela presença de espécies que constam na lista de espécies ameaçadas do Estado do Paraná (Mikich; & Bérnils, 2004): *Brycon orbygnianus* foi categorizado como em perigo, e *Brycon nattereri*, *Rhinelepis aspera*, e *Salminus brasiliensis* foram categorizados como vulneráveis, e ainda, *Pseudoplatystoma corruscans* e *Salminus hilarii* como quase ameaçadas. O simples fato de algumas espécies constarem em alguma lista de espécies ameaçadas já representa uma ameaça de extinção global ou local, e que a área em questão necessita de medidas apropriadas para sua conservação (Simic et al., 2007).

Finalmente, seja pela presença do grande número de espécies, dentre elas espécies migradoras ou ameaçadas, seja pelo registro de espécies ainda novas para a

ciência, podemos classificar o rio Laranjinha como um patrimônio da diversidade de peixes, portanto, merecedor de especial atenção no que se refere à sua preservação. Este trabalho pode ser considerado o passo inicial para subsidiar diversas ações de manejo e preservação.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos a Universidade Estadual do Norte do Paraná – Campus de Cornélio Procopio pela infraestrutura e logística, ao Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina pelo depósito dos voucher utilizado nesse trabalho. Pela ajuda em campo e em laboratório agradecemos ao Prof. Dr. Augusto S. Zanatta, ao Prof. Dr. Carlos David Canabarro Machado de Santana pelo auxílio na identificação das espécies da família Apterontidae, ao técnico laboratorial José Tavares. Aos estagiários de iniciação científica do GECON pelo auxílio nas expedições de coleta, triagens dos exemplares. Este estudo foi suportado pela Fundação Araucária por meio do Programa de Capacitação Docente das IEES-PR e por bolsas de iniciação científica. Pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) para Dhiego G. Ferreira, e Wilson F. da Silva e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) para Willian Ohara.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho, A. A., Pelicice, F. M., & Gomes, L. C. 2008. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Brazilian Journal of Biology*, 68(4), 1119-1132.

Agostinho, A. A., Gomes, L. C., & Pelicice, F. M. 2007. Ecology and management of fish resources in reservoirs in Brazil. Eduem.

Agostinho, A. A., Thomaz, S. M., & Gomes, L. C. 2005. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conservation Biology*, 19(3), 646-652.

Agostinho, A. A., Gomes, L. C., Suzuki, H. I., Júlio-Júnior, H. F. 2003. Migratory Fishes of the Upper Parana River Basin, Brazil. In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A.; (Org.). *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. 1ed. Victoria: World Fisheries Trust, p. 19-99.

Agostinho, A. A., Júlio Jr, H. F. 1999. Peixes da bacia do alto rio Paraná. In: Lowe-McConnell, R. H. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Edusp, São Paulo, 374-400.

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica. Relatório de Acompanhamento de Estudos e Projetos de Usinas Hidrelétricas de 18/10/2013. Acessado em: <http://www.aneel.gov.br/area.cfm?idArea=428>. Capturado em 22/10/2013: 2013

Balian, E.V., Segers, H., Lévêque, C., Martens, K. 2008. The Freshwater Animal Diversity Assessment: an overview of the results. *Hydrobiologia* 595: 627 - 637

Baumgartner, G., Pavanelli, C.S., Baumgartner, D., Bifi, A.G., Debona, T., Frana, V.A. 2012. Peixes do baixo rio Iguçu. Editora EDUEM, Maringá. 203 pp.

Britto, S.D.C., & Carvalho, E.D. 2006. Ecological attributes of fish fauna in the Taquaruçu reservoir, Paranapanema river (upper Paraná, Brazil): composition and spatial distribution. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 18(4): 377-388.

Buckup, P.A., Menezes, N.A., Ghazzi, M.S. (eds.). 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro, Museu Nacional. (Série Livros, 23). 195 pp.

Carvalho, E. D., Batista Da Silva, V. F., Fujihara, C. Y., Henry, R., & Foresti, F. 1998. Diversity of fish species in the River Paranapanema-Jurumirim Reservoir transition region (São Paulo, Brazil). *Italian Journal of Zoology* 65(S1): 325-330.

Castro, R. M. C., Casatti, L., Santos, H. F., Melo, A. L. A., Martins, L. S. F., Ferreira, K. M., Gibran, F. Z., Benine, R. C., Carvalho, M., Ribeiro, A. C., Abreu, T. X., Bockmann, F. A., Dardis, G. Z. P., Stopiglia, R., Langeani, F. 2004. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do rio Grande no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* 4(1): 01-39.

Castro, R. M. C.; Casatti, L.; Santos, H. F.; Ferreira, K. M.; Ribeiro, A. C.; Benine, R. C.; Dardis, G. Z. P.; Melo, A. L. A.; Stopiglia, R.; Abreu, T. X.; Bockmann, F. A.; Carvalho, M.; Gibran, F. Z.; Lima, F. C. T. 2003. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. *Biota Neotropica* 3(1): 1-31.

Castro, R. M. C., & Casatti, L. 1997. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River basin, southeastern Brazil. *Ichthyological exploration of freshwaters* 7(3): 337-352

Cionek, V.M., Sacramento, P.A., Zanatta, N., Ota, R.P., Corbetta, D.F., Benedito, E. 2012. Fishes from first order streams of lower Paranapanema and Ivaí rivers, upper Paraná River basin, Paraná, Brazil. *Check List* 8: 1158

Costa, A.D.A., Ferreira, D.G., Silva, W.F., Zanatta, A.S., Shibatta, O.A., & Galindo, B.A. 2013. Fishes (Osteichthyes: Actinopterygii) from the Penacho stream, upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. *Check List* 9(3): 519-523.

Dias, J.H., Britto, S.G.C., Vianna, N.C., & Garavello, J.C. 2004. Biological and ecological aspects of *Pinirampus pinirampu* (Spix, 1829) Siluriformes, Pimelodidae. Capivara reservoir, Paranapanema River Southern Brazil. *Acta Limnologica Brasileira* 16: 293-304.

Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.H., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81(2): 163-182.

Ferraris, C.J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.

Galves, W., Shibatta, O.A., & Jerep, F.C. 2009. Estudos sobre diversidade de peixes da bacia do alto rio Paraná: uma revisão histórica. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 30(2): 141-154.

Galves, W., Shibatta, O.A., & Jerepe, F.C. 2007. Fish, Taquara river basin, northern of the state of Paraná, Brazil. *Check List* 3(3): 353-359

Graça, W.J. and Pavanelli, C.S. 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá. EDUEM. 241 pp.

Gubiani, É.A., Holzbach, A.J., Baumgartner, G., Rezende Neto, L.B., Bergmann, F. 2006. Fish, Piquiri River, Upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. *Check List* 2 (3): 9-14

Gubiani, E.A., Daga, V.S., Frana, V.A., & da Graça, W.J. 2010. Fish, Toledo urban streams, São Francisco Verdadeiro River drainage, upper Paraná River basin, state of Paraná, Brazil. *Check List* 6(1): 45-48.

Hickman Jr, C.P., Roberts, L.S., Keen, S.L., Eisenhour, D.J., Larson, A., I'anson, H. 2013. *Princípios Integrados de Zoologia*. 15ª Edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Hoffmann, A.C., Orsi, M.L., & Shibatta, O.A. 2005. Diversidade de peixes do reservatório da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná, Brasil, ea importância dos grandes tributários na sua manutenção. *Iheringia, Série Zoológica* 95(3): 319-325.

Júlio Júnior, H.F., Tós, C.D., Agostinho, A.A. & Pavanelli, C.S. 2009. A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology*, 7(4):709-718.

Langeani, F., Castro, R.M.C., Oyakawa, O.T., Shibatta, O.A., Pavanelli, C.S., & Casatti, L. 2007. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* 7(3): 1-17.

Lévêque, C., Oberdorff, T., Paugy, D., Stiassny, M.L.J., Tedesco, P.A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 545–567

Lopes, C.M., Almeida, F.S., Orsi, M.L., Britto, S.G.D.C., Sirol, R.N., & Sodrê, L.M.K. 2007. Fish passage ladders from Canoas Complex- Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis*(Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology* 5(2): 131-138.

Lowe-McConnell, R.H. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Edusp, São Paulo

Maier, A., Zawadzki, C.H., da Graça, W.J., Bifi. A.G. 2008. Fish, Barra Bonita River, Ivaí River drainage, upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. *Check List* 4(3): 336-340.

Mikich, S.B., Bérnils, R.S. 2004. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. Acessado em > <http://www.pr.gov.br/iap>. Capturado em 27 dez 2012

Mirande, J.M. 2009. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* 25: 1–40.

Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the world*. 4ª Ed. Editora John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey

Orsi, M. L. 2010. *Estratégias reprodutivas de peixes da Região média-baixa do Rio Paranapanema, Reservatório de Capivara*. São Paulo. Blucher Acadêmico. 115p.

Paula, F. M. 2006. *Diversidade genética de Prochilodus Lineatus (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidrelétricas do Complexo Canoas - Rio Paranapanema*. Dissertação apresentada ao curso 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.

Pavanelli, C. S., Caramaschi, E. P. 1997. Composition of the ichthyofauna of two small tributaries of the Paraná river, Porto Rico, Paraná State, Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 8: 23-32.

Queiroz, L.J., Torrente-Villarza, G., Vieira, F.G., Ohara, W.M., Zuanon, J.A., Doria, C.R.C. 2013. Fishes of Cuniã Lake, Madeira River Basin, Brazil. *Checklist* 9(3): 540–548.

Sabino, J., Zuanon, J.A. 1998. A stream fish assemblage in Central Amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 8: 201-210.

Santos, L. J. C., Oka-Fiori, C., Canali, N. E., Fiori, A. P., Silveira, C. T. D., Silva, J. M. F. D., Ross, J. L. S. 2010. Mapeamento geomorfológico do Estado do Paraná. *Revista Brasileira de geomorfologia*, 7: 03-12.

Shibatta, O.A., Orsi, M.L., Bennemann, S.T., Silva-Souza, A.T. 2002. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi; pp. 403-423, in: M.E. Medri, E. Bianchini, O.A. Shibatta, J.A. Pimenta. *A bacia do rio Tibagi*. Londrina

Shibatta, O.A., Orsi, M.L., Bennemann, S.T. 2006. Os peixes do Parque Estadual Mata dos Godoy; pp. 156-167, in: J.M. Torezan (Org). *Ecologia do Parque Estadual Mata do Godoy*. Londrina: Itedes, 2006.

Shibatta, O.A., Gealh, A.M., Bennemann, S.T. 2007. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica* 7: 125 – 134

Simic, V., Simic, S., Paunovic, M., Cakic, P. 2007. Model of the assessment of the critical risk of extinction and the priorities of protection of endangered aquatic species at the national level. *Biodiversity Conservation* 16: 2471–2493.

Schwartz, W. 2006. Meio Ambiente Finalmente, a escada de peixes no Laranjinha Demorou sete anos para ficar pronta e será "inaugurada" na piracema que se aproxima. Folha de Londrina. Londrina, 27 out

Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R., Cushing, C.E. 1980. The river continuum concept. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 37 (1): 130-137

Vianna, N.C., Nogueira, M.G. 2008. Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*: 20: 139-151.

Wilcove, D.S., Rothstein, D., Dubow, J., Phillips, A., Losos, E. 1998. Quantifying threats to imperiled species in the United States. *BioScience* 48(8): 607-615.

ANEXO I

Catálogo fotográficos dos peixes do rio Laranjinha

CHARACIFORMES

Acestrorhynchidae

Figura 1 - *Acestrorhynchus lacustris* (Lütken 1875) - CP: 21,5cm – RG: 12145 100

Anostomidae

Figura 2 - *Leporellus vittatus* (Valenciennes 1850) – CP: 20cm – RG: 7527..... 100

Figura 3 - *Leporinus amblyrhynchus* Garavello & Britski 1987 – CP: 10,5cm – RG: 10015..... 100

Figura 4 - *Leporinus friderici* (Bloch 1794) – CP: 14,5 cm – RG: 3247..... 100

Figura 5 - *Leporinus obtusidens* (Valenciennes 1837) – CP: 19 cm – RG: 10027 ... 101

Figura 6 - *Leporinus octofasciatus* Steindachner 1915 – CP: 12cm – RG: 9995..... 101

Figura 7 - *Leporinus striatus* Kner 1858 – CP: 13 cm – RG: 8194..... 101

Figura 8 - *Schizodon intermedius* Garavello & Britski 1990 – CP: 18,8 cm – RG:3622 101

Figura 9 - *Schizodon nasutus* Kner 1858 – CP: 16,2 cm – RG: 11778..... 102

Characidae

Figura 10 - *Aphyocharax cf. dentatus* Eigenmann & Kennedy, 1903 – CP: 4 cm – RG: 2444..... 102

Figura 11 - *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 – CP: 5,2cm – RG: 5872 .. 102

Figura 12 - *Astyanax bockmanni* Vari & Castro 2007 – CP: 7,2 cm – RG: 10274..... 103

Figura 13 - *Astyanax cf. paranae* Eigenmann 1914 – CP: 7,1 cm – RG: 11360 103

Figura 14 - *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) – CP: 9,7 cm – RG: 10010 103

Figura 15 - *Brycon nattereri* Günther 1864 – CP: 21,2 cm – RG: 9990..... 104

Figura 16 - *Brycon orbignyanus* (Valenciennes 1850)..... 104

Figura 17 - *Bryconamericus iheringii* (Boulenger 1887) – CP: 4,2 cm – RG: 10506. 104

Figura 18 - *Bryconamericus stramineus* Eigenmann 1908 – CP: 4,1 cm – RG: 10041 104

Figura 19 - *Cheirodon stenodon* Eigenmann 1915 – CP: 3 cm – RG: 10528..... 105

Figura 20 - *Galeocharax knerii* (Steindachner 1879) – CP: 12,2 cm – RG: 3214 105

Figura 21 - *Hyphessobrycon eques* (Steindachner 1882) - CP: 3 cm – RG: 2430..... 105

Figura 22 - *Moenkhausia intermedia* Eigenmann 1908 – CP: 9,2 cm – RG: 6782..... 106

Figura 23 - *Odontostilbe* sp. – CP: 6,5 cm – RG: 10032 106

Figura 24 - *Oligosarcus paranensis* Menezes & Géry 1983 – CP: 13,5 cm – RG: 4116 106

Figura 25 - *Piabina argentea* Reinhardt 1867 - CP: 8,6 cm – RG: 3166..... 106

Figura 26 - *Salminus brasiliensis* (Cuvier 1816) – CP: 35,5 cm – RG: 8192..... 107

Figura 27 - *Salminus hilarii* Valenciennes 1850 – CP: 26 cm – RG: 826J..... 107

Figura 28 - *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann 1915) – CP: 2,4 cm – RG: 10044 107

Figura 29 - *Triportheus nematurus* (Kner 1858) – CP: 20,5 cm – RG: 6716..... 107

Crenuchidae

Figura 30 - *Characidium aff. zebra* Eigenmann 1909 – CP: 6,7 cm – RG: 9113 108

Curimatidae

- Figura 31 - *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez 1948) – CP: 9,8 cm – RG: 10272 108
 Figura 32 - *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez 1948) – CP: 10 cm – RG: 1718..... 108

Erythrinidae

- Figura 33 - *Hoplias malabaricus* (Bloch 1794) – CP: 14,5 cm – RG: 3160..... 109

Parodontidae

- Figura 34 - *Apareiodon ibitiensis* Campos, 1944 – CP: 8,2 cm – RG: 10025 109
 Figura 35 - *Apareiodon piracicabae* (Eigenmann, 1907) – CP: 10,3 cm – RG: 10017 109
 Figura 36 - *Parodon nasus* Kner 1859 – CP: 13 cm - RG: 11767..... 109

Prochilodontidae

- Figura 37 - *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1837) – CP: 23,4 cm – RG: 3143..... 110

Serrasalmidae

- Figura 38 - *Metynnis maculatus* (Kner 1858) – CP: 13,5 cm – RG: 4052..... 110
 Figura 39 - *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) – CP: 27 cm - RG: 6485.... 110
 Figura 40 - *Serrasalmus maculatus* Kner 1858 – CP: 16 cm - RG: 9987..... 111

CYPRINIDONTIFORMES**Poeciliidae**

- Figura 41 - *Phalloceros harpagos* Lucinda 2008 – a) ♀ - CP: 2,2 cm – RG: 9116, b) ♂ - CP: 3,8 – RG: 9115..... 111
 Figura 42 - *Poecilia reticulata* Peters 1859 – a) ♀ - CP: 3,0 cm – RG: 2775, b) ♂ - CP: 1,6 cm – RG: 2776..... 112

CYPRINIFORMES**Cyprinidae**

- Figura 43 - *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758 112

GYMNOTIFORMES**Apteronotidae**

- Figura 44 - *Apteronotus* aff. *albifrons* (Linnaeus, 1766) – CP: 16 cm – RG: 2287 113
 Figura 45 - *Apteronotus* cf. *caudimaculosus* Santana, 2003 – CP: 22,2 cm – RG: 4042 113
 Figura 46 - *Apteronotus* sp. – CC: 3cm – RG: 2288..... 113

Gymnotidae

- Figura 47 - *Gymnotus* sp.– CP: 15,82 – RG: MZUEL 6452 114
 Figura 48 - *Gymnotus sylvius* Albert & Fernandes-Matioli 1999 – CP: 25,2 cm – RG: 10030..... 114

Sternopygidae

- Figura 49 - *Eigenmannia trilineata* López & Castello 1966 – CP: 18,5 cm – RG: 6099 114
 Figura 50 - *Sternopygus macrurus* (Bloch & Schneider 1801) – CP: 20 cm – RG: 5861 115

PERCIFORMES**Cichlidae**

- Figura 51 - *Australoheros* sp. – CP: 7,8 cm - RG: 10420 115
 Figura 52 - *Crenicichla britskii* Kullander 1982 – CP: 10,5 cm – RG: 5863 115
 Figura 53 - *Crenicichla jaguarensis* Haseman 1911 – CP: 9 cm – RG: 8193 116
 Figura 54 - *Crenicichla jupiaensis* Britski & Luengo 1968 – CP: 9,5 cm – RG: 10057 116
 Figura 55 - *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) – CP: 8,5 cm - RG: 10549 116
 Figura 56 - *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) – CP: 22 cm - RG: 2046 117

SILURIFORMES**Aspredinidae**

- Figura 57 - *Bunocephalus larai* Ihering 1930 – CP: 5 cm – RG: 9335 . a) Vista dorsal, b) Vista lateral 117

Auchenipteridae

- Figura 58 - *Ageneiosus militaris* Valenciennes 1835 – CP: 16,5 cm – RG: 6711 118
 Figura 59 - *Glanidium cesarpinto* Ihering, 1928 – CP: 8cm – RG: 4053 118
 Figura 60 - *Tatia neivai* (Ihering 1930) – CP: 5 cm – RG: 12084 118

Callichthyidae

- Figura 61 - *Callichthys callichthys* (Linnaeus 1758) – CC: 2,2 cm – RG: 2758J 119
 Figura 62 - *Corydoras aeneus* (Gill 1858) – CP: 3 cm – RG: 5882 119
 Figura 63 - *Hoplosternum littorale* (Hancock 1828) – CP: 18 cm – RG: 715M 119

Doradidae

- Figura 64 - *Rhinodoras dorbignyi* (Kner 1855) – CP: 11,5 cm – RG: 6573 120

Heptapteridae

- Figura 65 - *Cetopsorhamdia iheringi* Schubart & Gomes 1959 – CP: 8,5 – RG: 9803120
 Figura 66 - *Imparfinis mirini* Haseman 1911 – CP: 11 cm – RG: 5869 120
 Figura 67 - *Imparfinis schubarti* (Gomes, 1956) – CP: 8,1 cm – RG: MZUEL 6437. 121
 Figura 68 - *Phenacorhamdia tenebrosa* (Schubart 1964) – CP: 8,5 cm – RG: 5162J .. 121
 Figura 69 - *Pimelodella meeki* Eigenmann 1910 – CP: 9,5 cm – RG: 1404J 121
 Figura 70 - *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard 1824) – CP: 17 cm – 5914 121

Loricariidae

- Figura 71 - *Ancistrus* cf. *cirrhusus* (Valenciennes 1836) – CP: 6,3 cm – RG: 6111... 122
 Figura 72 - *Hisonotus insperatus* Britski & Garavello 2003 – CP: 2,2 cm – RG: 10559 122
 Figura 73 - *Hypostomus albopunctatus* (Regan 1908) – CP: 15 cm – RG: 3625 122

Figura 74 - <i>Hypostomus ancistroides</i> (Ihering 1911) – CP: 11 cm – RG: 10548	122
Figura 75 - <i>Hypostomus</i> cf. <i>paulinus</i> (Ihering 1905) – CP: 8 cm – RG: 10275	123
Figura 76 - <i>Hypostomus</i> cf. <i>topavae</i> (Godoy 1969) – CP: 11 cm – RG: 3651.....	123
Figura 77 - <i>Hypostomus hermanni</i> (Ihering 1905) – CP: 13 cm – RG: 12112	123
Figura 78 - <i>Hypostomus iheringii</i> (Regan 1908) – CP: 15,3 – RG: 2170.....	124
Figura 79 - <i>Hypostomus nigromaculatus</i> (Schubart 1964) – CP: 9 cm – RG: 10557 .	124
Figura 80 - <i>Hypostomus regani</i> (Ihering 1905) – CP: 15,5 cm – RG: 8257	124
Figura 81 - <i>Hypostomus strigaticeps</i> (Regan 1908) – CP: 15 cm – RG: 9988	125
Figura 82 - <i>Loricaria prolixa</i> Isbrücker & Nijssen, 1978 – CP: 21 cm – RG: 10045 ..	125
Figura 83 - <i>Loricaria</i> sp. – CP: 14 cm - RG: 5871.....	125
Figura 84 - <i>Loricariichthys platymetopon</i> Isbrücker & Nijssen 1979 – CP: 13,5 cm – RG: 9294	125
Figura 85 - <i>Megalancistrus parananus</i> (Peters 1881) – CP: 14 cm – RG: 8260	126
Figura 86 - <i>Neoplecostomus yapo</i> Zawadzki, Pavanelli & Langeani 2008 – CP: 10 cm – RG: 9802	126
Figura 87 - <i>Otothyropsis biannicus</i> Calegari, Lehmann A. & Reis 2013 – CP: 4 cm – RG: 10564	126
Figura 88 - <i>Pterygoplichthys ambrosettii</i> (Holmberg 1893) – CP: 27,2 cm – RG: 6110	126
Figura 89 - <i>Rhinelepis aspera</i> Spix & Agassiz 1829 – CP: 17,5 cm – RG: 9991	127
Figura 90 - <i>Rineloricaria latirostris</i> (Boulenger 1900) – CP:13 cm – RG: 7475	127
Figura 91 - <i>Rineloricaria pentamaculata</i> Langeani & de Araujo 1994 – CP: 15,5 cm – RG: 12152	127

Pimelodidae

Figura 92 - <i>Iheringichthys labrosus</i> (Lütken 1874) – CP: 23 cm – RG:7932.....	128
Figura 93 - <i>Megalonema platanum</i> (Günther 1880) – CP: 16,5 cm – RG: 1984.....	128
Figura 94 - <i>Pimelodus maculatus</i> Lacepède 1803 – CP: 22,5 cm – RG: 7716.....	128
Figura 95 - <i>Pimelodus microstoma</i> Steindachner 1877 – CP: 16 cm – RG: 10013	129
Figura 96 - <i>Pimelodus paranaensis</i> Britski & Langeani 1988 – CP: 17,5 cm – RG: 3285	129
Figura 97 - <i>Pinirampus pirinampu</i> (Spix & Agassiz 1829) – CP: 40,4 cm – RG: 1951	129
Figura 98 - <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Spix & Agassiz 1829) – CP: 42,65 cm – RG: 6714.....	130
Figura 99 - <i>Sorubim lima</i> (Bloch & Schneider 1801) – CP: 40 cm – RG: 6713.....	130

Pseudopimilodidae

Figura 100 - <i>Pseudopimelodus pulcher</i> (Boulenger 1887) – CP: 3,8 cm – RG: 5168J	130
---	-----

Trichomycteridae

Figura 101 - <i>Trichomycterus diabolus</i> Bockmann, Casatti & de Pinna 2004 – CP: 6,2 cm – RG: 5858.....	131
Figura 102 - <i>Trichomycterus davisii</i> (Haseman 1911) – CP: 4,3 cm – RG: MZUEL 6426	131

SYNBRANCHIFORMES

Synbranchidae

Figura 103 - <i>Synbranchus marmoratus</i> Bloch 1795 – CT: 9 cm – RG: 10040.....	131
---	-----

CHARACIFORMES**Acestrorhynchidae**

Figura 1 - *Acestrorhynchus lacustris* (Lütken 1875) - CP: 21,5cm – RG: 12145

Anostomidae

Figura 2 - *Leporellus vittatus* (Valenciennes 1850) – CP: 20cm – RG: 7527



Figura 3 - *Leporinus amblyrhynchus* Garavello & Britski 1987 – CP: 10,5cm – RG: 10015



Figura 4 - *Leporinus friderici* (Bloch 1794) – CP: 14,5 cm – RG: 3247



Figura 5 - *Leporinus obtusidens* (Valenciennes 1837) – CP: 19 cm – RG: 10027



Figura 6 - *Leporinus octofasciatus* Steindachner 1915 – CP: 12cm – RG: 9995



Figura 7 - *Leporinus striatus* Kner 1858 – CP: 13 cm – RG: 8194



Figura 8 - *Schizodon intermedius* Garavella & Britski 1990 – CP: 18,8 cm – RG:3622



Figura 9 - *Schizodon nasutus* Kner 1858 – CP: 16,2 cm – RG: 11778

Characidae



Figura 10 - *Aphyocharax* cf. *dentatus* Eigenmann & Kennedy, 1903 – CP: 4 cm – RG: 2444



Figura 11 - *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 – CP: 5,2cm – RG: 5872



Figura 12 - *Astyanax bockmanni* Vari & Castro 2007 – CP: 7,2 cm – RG: 10274



Figura 13 - *Astyanax cf. paranae* Eigenmann 1914 – CP: 7,1 cm – RG: 11360



Figura 14 - *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) – CP: 9,7 cm – RG: 10010



Figura 15 - *Brycon nattereri* Günther 1864 – CP: 21,2 cm – RG: 9990



Figura 16 - *Brycon orbygnianus* (Valenciennes 1850) – CP: 27,5 cm – RG: 3120J



Figura 17 - *Bryconamericus iheringii* (Boulenger 1887) – CP: 4,2 cm – RG: 10506



Figura 18 - *Bryconamericus stramineus* Eigenmann 1908 – CP: 4,1 cm – RG: 10041



Figura 19 - *Cheirodon stenodon* Eigenmann 1915 – CP: 3 cm – RG: 10528



Figura 20 - *Galeocharax knerii* (Steindachner 1879) – CP: 12,2 cm – RG: 3214



Figura 21 – *Hyphessobrycon eques* (Steindachner 1882) - CP: 3 cm – RG: 2430



Figura 22 - *Moenkhausia intermedia* Eigenmann 1908 – CP: 9,2 cm – RG: 6782



Figura 23 - *Odontostilbe* sp. – CP: 6,5 cm – RG: 10032



Figura 24 - *Oligosarcus paranensis* Menezes & Géry 1983 – CP: 13,5 cm – RG: 4116



Figura 25 - *Piabina argentea* Reinhardt 1867 - CP: 8,6 cm – RG: 3166



Figura 26 - *Salminus brasiliensis* (Cuvier 1816) – CP: 35,5 cm – RG: 8192



Figura 27 - *Salminus hilarii* Valenciennes 1850 – CP: 26 cm – RG: 826J



Figura 28 - *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann 1915) – CP: 2,4 cm – RG: 10044



Figura 29 - *Triportheus nematurus* (Kner 1858) – CP: 20,5 cm – RG: 6716

Crenuchidae

Figura 30 - *Characidium* aff. *zebra* Eigenmann 1909 – CP: 6,7 cm – RG: 9113

Curimatidae

Figura 31 - *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez 1948) – CP: 9,8 cm – RG: 10272



Figura 32 - *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez 1948) – CP: 10 cm – RG: 1718

Erythrinidae

Figura 33 - *Hoplias malabaricus* (Bloch 1794) – CP: 14,5 cm – RG: 3160

Parodontidae

Figura 34 - *Apareiodon ibitiensis* Campos, 1944 – CP: 8,2 cm – RG: 10025



Figura 35 - *Apareiodon piracicabae* (Eigenmann, 1907) – CP: 10,3 cm – RG: 10017



Figura 36 - *Parodon nasus* Kner 1859 – CP: 13 cm - RG: 11767

Prochilodontidae

Figura 37 - *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1837) – CP: 23,4 cm – RG: 3143

Serrasalminidae

Figura 38 - *Metynnis maculatus* (Kner 1858) – CP: 13,5 cm – RG: 4052



Figura 39 - *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) – CP: 27 cm - RG: 6485



Figura 40 - *Serrasalmus maculatus* Kner 1858 – CP: 16 cm - RG: 9987

CYPRINIDONTIFORMES

Poeciliidae



Figura 41 - *Phalloceros harpagos* Lucinda 2008 – a) ♀ - CP: 2,2 cm – RG: 9116, b) ♂
- CP: 3,8 – RG: 9115



Figura 42 - *Poecilia reticulata* Peters 1859 – a) ♀ - CP: 3,0 cm – RG: 2775, b) ♂ - CP: 1,6 cm – RG: 2776

CYPRINIFORMES

Cyprinidae



Figura 43 - *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758 – CP: 44,10 cm – RG: 4787J

GYMNOTIFORMES**Apteronotidae**

Figura 44 - *Apterionotus* aff. *albifrons* (Linnaeus, 1766) – CP: 16 cm – RG: 2287



Figura 45 - *Apterionotus* cf. *caudimaculosus* Santana, 2003 – CP: 22,2 cm – RG: 4042



Figura 46 - *Apterionotus* sp. – CC: 3cm – RG: 2288

Gymnotidae

Figura 47 - *Gymnotus sp.* – CP: 15,82 cm – RG: MZUEL 6452



Figura 48 - *Gymnotus sylvius* Albert & Fernandes-Matioli 1999 – CP: 25,2 cm – RG: 10030

Sternopygidae

Figura 49 - *Eigenmannia trilineata* López & Castello 1966 – CP: 18,5 cm – RG: 6099



Figura 50 - *Sternopygus macrurus* (Bloch & Schneider 1801) – CP: 20 cm – RG: 5861

PERCIFORMES

Cichlidae



Figura 51 - *Australoheros* sp. – CP: 7,8 cm - RG: 10420



Figura 52 - *Crenicichla britskii* Kullander 1982 – CP: 10,5 cm – RG: 5863



Figura 53 - *Crenicichla jaguarensis* Haseman 1911 – CP: 9 cm – RG: 8193



Figura 54 - *Crenicichla jupiaensis* Britski & Luengo 1968 – CP: 9,5 cm – RG: 10057



Figura 55 - *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) – CP: 8,5 cm - RG: 10549



Figura 56 - *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) – CP: 22 cm - RG: 2046

SILURIFORMES

Aspredinidae

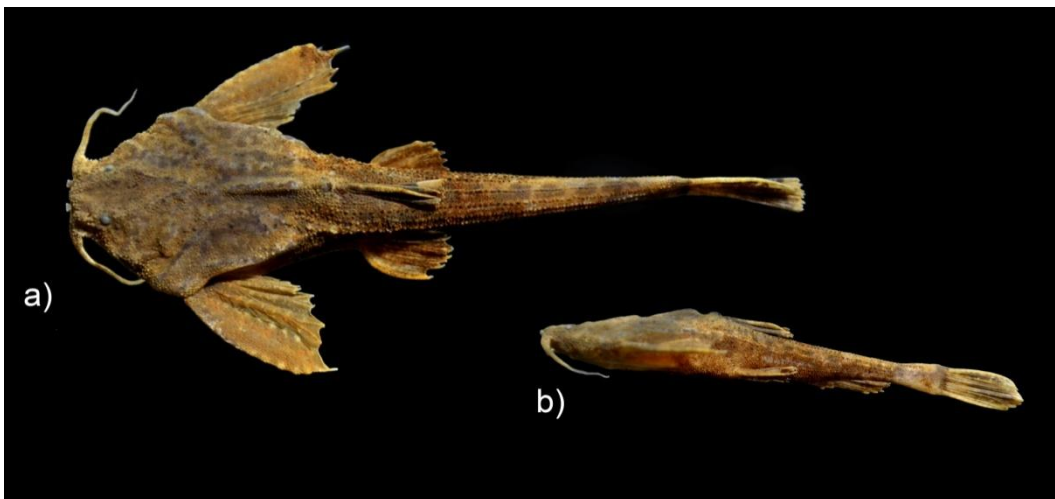


Figura 57 - *Bunocephalus larai* Ihering 1930 – CP: 5 cm – RG:9335 . a) Vista dorsal, b) Vista lateral

Auchenipteridae

Figura 58 - *Ageneiosus militaris* Valenciennes 1835 – CP: 16,5 cm – RG: 6711



Figura 59 - *Glanidium cesarpintoii* Ihering, 1928 – CP: 8cm – RG: 4053



Figura 60 - *Tatia neivai* (Ihering 1930) – CP: 5 cm – RG: 12084

Callichthyidae

Figura 61 - *Callichthys callichthys* (Linnaeus 1758) – CC: 2,2 cm – RG: 2758J



Figura 62 - *Corydoras aeneus* (Gill 1858) – CP: 3 cm – RG: 5882



Figura 63 - *Hoplosternum littorale* (Hancock 1828) – CP: 18 cm – RG: 715M

Doradidae

Figura 64 - *Rhinodoras dorbignyi* (Kner 1855) – CP: 11,5 cm – RG: 6573

Heptapteridae

Figura 65 - *Cetopsorhamdia iheringi* Schubart & Gomes 1959 – CP: 8,5 – RG: 9803



Figura 66 - *Imparfinis mirini* Haseman 1911 – CP: 11 cm – RG: 5869



Figura 67 - *Imparfinis schubarti* (Gomes, 1956) – CP: 8,1 cm – RG: MZUEL 6437



Figura 68 - *Phenacorhamdia tenebrosa* (Schubart 1964) – CP: 8,5 cm – RG:5162J



Figura 69 - *Pimelodella meeki* Eigenmann 1910 – CP: 9,5 cm – RG: 1404J



Figura 70 - *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard 1824) – CP: 17 cm – 5914

Loricariidae



Figura 71 - *Ancistrus* cf. *cirrhosus* (Valenciennes 1836) – CP: 6,3 cm – RG: 6111



Figura 72 - *Hisonotus insperatus* Britski & Garavello 2003 – CP: 2,2 cm – RG: 10559



Figura 73 - *Hypostomus albopunctatus* (Regan 1908) – CP: 15 cm – RG: 3625



Figura 74 - *Hypostomus ancistroides* (Ihering 1911) – CP: 11 cm – RG: 10548



Figura 75 - *Hypostomus cf. paulinus* (Ihering 1905) – CP: 8 cm – RG: 10275



Figura 76 - *Hypostomus cf. topavae* (Godoy 1969) – CP: 11 cm – RG: 3651



Figura 77 - *Hypostomus hermanni* (Ihering 1905) – CP: 13 cm – RG: 12112



Figura 78 - *Hypostomus iheringii* (Regan 1908) – CP: 15,3 – RG: 2170



Figura 79 - *Hypostomus nigromaculatus* (Schubart 1964) – CP: 9 cm – RG: 10557



Figura 80 - *Hypostomus regani* (Ihering 1905) – CP: 15,5 cm – RG: 8257



Figura 81 - *Hypostomus strigaticeps* (Regan 1908) – CP: 15 cm – RG: 9988



Figura 82 - *Loricaria prolixa* Isbrücker & Nijssen, 1978 – CP: 21 cm – RG: 10045



Figura 83 - *Loricaria* sp. – CP: 14 cm - RG: 5871



Figura 84 - *Loricariichthys platymetopon* Isbrücker & Nijssen 1979 – CP: 13,5 cm – RG: 9294



Figura 85 - *Megalancistrus parananus* (Peters 1881) – CP: 14 cm – RG: 8260



Figura 86 - *Neoplecostomus yapo* Zawadzki, Pavanelli & Langeani 2008 – CP: 10 cm – RG: 9802



Figura 87 - *Otothyropsis biannicus* Calegari, Lehmann A. & Reis 2013 – CP: 4 cm – RG: 10564



Figura 88 - *Pterygoplichthys ambrosettii* (Holmberg 1893) – CP: 27,2 cm – RG: 6110



Figura 89 - *Rhinelepis aspera* Spix & Agassiz 1829 – CP: 17,5 cm – RG: 9991



Figura 90 - *Rineloricaria latirostris* (Boulenger 1900) – CP: 13 cm – RG: 7475



Figura 91 - *Rineloricaria pentamaculata* Langeani & de Araujo 1994 – CP: 15,5 cm – RG: 12152

Pimelodidae

Figura 92 - *Iheringichthys labrosus* (Lütken 1874) – CP: 23 cm – RG:7932



Figura 93 - *Megalonema platanum* (Günther 1880) – CP: 16,5 cm – RG: 1984



Figura 94 - *Pimelodus maculatus* Lacepède 1803 – CP: 22,5 cm – RG: 7716



Figura 95 - *Pimelodus microstoma* Steindachner 1877 – CP: 16 cm – RG: 10013



Figura 96 - *Pimelodus paranaensis* Britski & Langeani 1988 – CP: 17,5 cm – RG: 3285



Figura 97 - *Pinirampus pirinampu* (Spix & Agassiz 1829) – CP: 40,4 cm – RG: 1951



Figura 98 - *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz 1829) – CP: 42,65 cm – RG: 6714



Figura 99 - *Sorubim lima* (Bloch & Schneider 1801) – CP: 40 cm – RG: 6713

Pseudopimilodidae

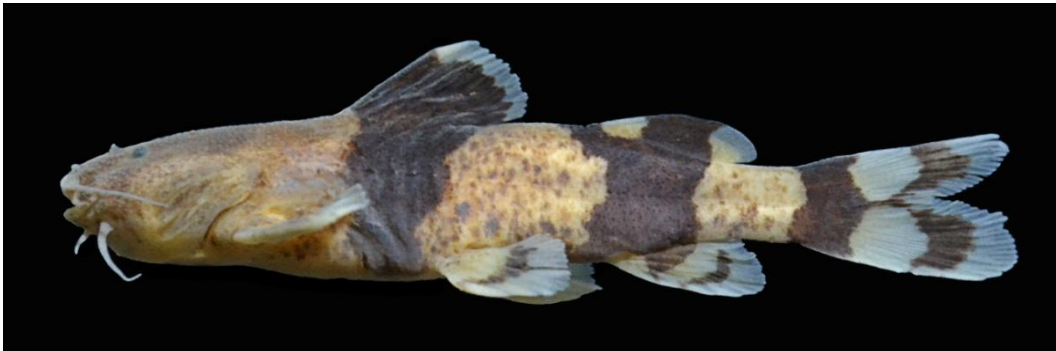


Figura 100 - *Pseudopimelodus pulcher* (Boulenger 1887) – CP: 3,8 cm – RG: 5168J

Trichomycteridae

Figura 101 - *Trichomycterus diabolus* Bockmann, Casatti & de Pinna 2004 – CP: 6,2 cm – RG: 5858



Figura 102 - *Trichomycterus davisi* (Haseman 1911) – CP: 4,3 cm – RG: MZUEL 6426

SYNBRANCHIFORMES**Synbranchidae**

Figura 103 - *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 – CT: 9 cm – RG: 10040

4.2 Capítulo 2

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF 13
POLIMORFIC MICROSATELLITE LOCI IN *Hypostomus
ancistroides* (TELEOSTEI, LORICARIIDAE) AND CROSS-
AMPLIFICATION IN RELATED SPECIES**

Este trabalho foi submetido à revista *Journal of Fish Biology*

Isolation and characterization of 13 polymorphic microsatellite loci in *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) and cross-amplification in related species

B. A. GALINDO^{†*}, D. G. FERREIRA*, F. S. ALMEIDA* AND S. H. SOFIA*

[†]*Laboratório de Genética e Conservação (GECON), Universidade Estadual do Norte*

Paraná, Rua Portugal, 340, Cornélio Procópio, PR, 86300-000, Brazil

**Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia*

Cid, km 380, Londrina, PR, 86051-980, Brazil

[Short title: Microsatellite in *Hypostomus ancistroides*](#)

* Author to whom correspondence should be addressed. Telephone: +55 43 39041922; Fax: +55 43 39041916 email: bruno@uenp.edu.br

ABSTRAC

This study reports thirteen polymorphic microsatellite loci in the armoured catfish *Hypostomus ancistroides*, and assesses their utility as highly polymorphic markers for population genetic studies. The analysis of 30 individuals revealed a total of ninety-nine different alleles (ranging from two to fifteen alleles per locus), with an average of 7.62 alleles per locus. The observed and expected heterozygosity ranged from 0.103 to 0.931 and from 0.102 to 0.906, respectively. From the 13 loci presented herein, only one showed significant deviations from Hardy – Weinberg equilibrium, probably due to the presence of null alleles, inferred from the excess of homozygous genotypes. Cross-transferability was tested in 60 individuals of other 13 Loricariidae and one Callichthyid species, and results indicate that most of these primer pairs will probably be useful for population genetic studies of almost all these species.

Keywords: *Armoured catfishes; genomic library; Hypostominae; Neotropical fish.*

Fish of the *Hypostomus* genus (Loricariidae, Hypostominae) comprise one the most diverse and complex group of South-American armoured catfishes, with about 130 species scientifically recognized (Weber, 2003; Zawadzki *et al.*, 2013). Widely distributed throughout the South American continent, the maximum diversity in number of species of *Hypostomus* occurs in rivers of the Paraná-Paraguay system (Weber, 2003; Oyakawa *et al.*, 2005; Ferraris, 2007).

Within the genus, the species *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) is an usual and widely distributed species, occurring throughout of the upper Paraná River system, where it was originally described (Weber, 2003; Hollanda Carvalho, 2011), being also found in the costal drainage of the Ribeira de Iguape River (Oyakawa *et al.*, 2005; Hollanda Carvalho, 2011). Members of this species are medium-sized fish reaching about 21 cm in length, which are provided with light brown dermal plates covering the entire body surface, with round black spots scattered throughout the body (Graça & Pavanelli, 2007). These fish exhibit nocturnal habits, usually occupying microhabitats composed of rocks and foliage on the bottom of river and stream beds (Lowe-McConnell, 1999; Casatti, 2002).

Hypostomus ancistroides is an important component of the ichthyofauna of paranean rivers (Smith *et al.*, 2007; Langeani *et al.*, 2007) and streams of the basin (Cunico *et al.*, 2009; Pazian *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013). Like other species of the genus, *H. ancistroides* is a benthic species that shows parental care (Suzuki *et al.*, 2000) and have sedentary behaviour (Zawadzki *et al.*, 2005) and detritivorous feeding habit (Oliveira & Bennemann, 2005), although individuals of this species can also exhibit herbivorous habits, feeding on algae (Casatti, 2002).

Despite the wide geographical distribution and the ecological importance of this species in freshwater fish communities, the genetic diversity and population structure of

H. ancistroides is still poorly known. One of the main causes of this fact is probably the lack of description of microsatellite primers in this species in the literature. Microsatellites are co-dominant and highly polymorphic molecular markers (Sunnucks, 2000; Zane *et al.*, 2002), which are among the most informative tools for genetic population studies (Frankham *et al.*, 2010). However, in most cases, the use of microsatellite technique is limited by the lack of description of primers in the species of interest (Zane *et al.*, 2002). Most species of Neotropical freshwater fish fauna still have no descriptions of primers used to amplify microsatellite loci (Silva & Hilsdorf, 2011). Particularly regarding *Hypostomus*, up to this moment, only the study by Telles *et al.* (2010) brings 10 microsatellite primers characterized in *H. gymnorhynchus* (Norman, 1926). However, most of these primers showed low polymorphism after amplification.

Considering that nowadays the freshwater ecosystems are constantly under different anthropogenic threats (Dudgeon *et al.*, 2006; Strayer & Dudgeon, 2010), the search for molecular tools that allow assessment to the genetic diversity of their natural populations is of great importance. The knowledge of genetic diversity and population structure is essential to the establishment of management and conservation actions (Carvalho, 1993; Hurt & Hedrick, 2004; Frankham *et al.*, 2010). Thus, the current study describes 13 novel polymorphic microsatellite loci in the Neotropical catfish *Hypostomus ancistroides*. The transferability of these primers was also tested in 13 Loricariidae and in one Callichthyid species.

Genomic DNA was extracted from muscle tissues of *H. ancistroides* using the protocol described by Almeida *et al.* (2001). The genomic library enriched for microsatellites in *H. ancistroides* was developed based on the protocol described by Billotte *et al.* (1999), including minor modifications employed by Ferreira *et al.* (2013). About 5 µg of DNA was digested with 50 U of *RsaI* and specific adapters *RsaI*-21

(5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3') and *RsaI*-25 (5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA3') were linked to the digested DNA using 5 U T4 DNA ligase (Invitrogen; www.invitrogen.com) in reaction buffer, with 10 µM of each adapter in a final volume of 200 µL incubated at 20°C for 2 h. After, DNA fragments were selected using three different probes: (AGA)₅, (CT)₈ and (GT)₈. After PCR (Polimerase Chain Reactions) amplifications, the fragments were cloned into the pGem®-T Easy (Promega; www.promega.com) vector, using 5 µL of amplification product, 50 ng vector, and 1 U T4 DNA ligase in reaction buffer at 4°C (overnight). Subsequently, ligation product was used to transform *Escherichia coli* (DH5- α lineage) cells. Then, 96 of the clones obtained were amplified using M13 forward and reverse primers. Sequencing was performed using the sequencing kit Big Dye Terminator™, v 3.1 (Applied Biosystems; www.appliedbiosystems.com), and carried out on an ABI 3500 xL sequencer. Sequences were analyzed through the BioEdit v.7.0 software (Hall, 1999) and those containing suitable microsatellite regions were exported to the Primer3 program (Rozen & Skaletsky, 2000). To test the potential presence of hairpin structures and primer-dimer problems, the AutoDimer software was used (Vallone & Butler, 2004). For the individual genotyping, also performed on an ABI 3500 XL automated sequencer, the selected forward primers were labelled with the M13 sequence (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') added to the 5'end (Schuelke, 2000).

Analysis of polymorphism and genetic diversity were conducted with a sample of 30 individuals of *H. ancistroides* collected in a stretch of the Laranjinha River (23°1'53.90"S / 50°26'51.90"W), southern Brazil. Cross-amplification was tested in 13 species of the family Loricariidae and in one species of the family Callichthyidae.

Among the species of the family Loricariidae, six belong to the genus *Hypostomus* - *H. albopunctatus* (Regan, 1908), *H. hermanni* (Ihering, 1905), *H.*

nigromaculatus (Schubart, 1964), *H. regani* (Jhering, 1905), *H. strigaticeps* (Regan, 1908) and *H. cf. topavae* (Godoy, 1969) - and other eight species belong to seven different genera of this family, they are: *Ancistrus cf. cirrhosus* (Valenciennes, 1836), *Loricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978), *Loricariichthys platymetopon* (Isbrücker & Nijssen, 1979) *Neoplecostomus yapo* (Zawadzki, Pavanelli & Langeani 2008) *Megalancistrus parananus* (Peters 1881), *Pterygoplichthys ambrosettii* (Holmberg 1893) and *Rhineleps aspera* (Spix & Agassiz, 1829). One species of the family Callichthyidae, *Corydoras aeneus* (Gill, 1858), was also tested. All species used in cross-amplification tests were sampled in the Laranjinha River Basin.

The PCR reactions were performed in a total volume of 5 μ L, according to the protocol of Ferreira *et al.* (2013), as follows: 1 X GoTaq Master Mix (Promega), 10 ng of template DNA, 1% glycerol, 0.125 μ M labeled primer (either FAM, HEX or NED, Applied Biosystems, CA), 0.125 μ M reverse primer, 0.0125 μ M forward primer. Amplifications were performed with an initial denaturation step at 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles of 94°C for 40s, 48°C, 54°C or 60°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 30 min. The PCR products were electrophoresed on an automated sequencer (ABI 3500 xL Genetic Analyzer). GeneScan 600 Liz (Applied Biosystems) was used as the standard molecular weight.

Individual genotyping was performed with the program GeneMarker v.1.85 (SoftGenetics; www.softgenetics.com) using manual verification. To calculate the number of alleles, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities and polymorphic information content (PIC), the program Cervus v.3.0 (Marshall *et al.*, 1998) was used. The endogamy coefficient (F_{IS}) was calculated using the program Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium (LD) tests were performed using the program GENEPOP 4.0.10

(Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008) and P values were subsequently adjusted using the sequential Bonferroni correction (Rice, 1989). The MicroChecker v.2.2.3 program (Van Oosterhout *et al.*, 2004) was used to test the presence of null alleles or eventual genotyping errors caused by allele dropout and stutter peaks. The paternity exclusion (Q) (Weir, 1996) and genetic identity probabilities (I) (Paetkau *et al.*, 1995) were estimated using Identity 1.0 (Wagner & Sefc, 1999).

Of the total clones sequenced, thirty had microsatellite sequences and, for all of them, pairs of primers were developed and tested. Of the 30 pairs of primers tested, 13 amplified successfully, showing polymorphisms, very conspicuous electropherogram peaks and absence of stutter. The microsatellite motifs found for these primers were mostly (60.3%) dinucleotide repeats (Table I).

The analysis of 30 *H. ancistroides* individuals revealed a total of 99 different alleles, which varied from two (*Hanc194*) to 15 (*Hanc07*), averaging 7.62 alleles per loci. The mean observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity found were 0.559 and 0.587, respectively. While the H_o values varied from 0.103 (*Hanc54*) to 0.931 (*Hanc72*), the H_e estimates ranged from 0.102 (*Hanc54*) to 0.906 (*Hanc32*).

The polymorphic information content (PIC) varied from 0.098 (*Hanc54*) to 0.880 (*Hanc32*), averaging 0.549. Thus, following the arbitrary scale proposed by Botstein *et al.* (1980), seven (*Hanc02*, *Hanc06*, *Hanc07*, *Hanc12*, *Hanc143*, *Hanc32* and *Hanc72*) of the loci presented herein were highly informative, showing PIC values above 0.5 (Table I); other four loci (*Hanc01*, *Hanc09*, *Hanc184* and *Hanc194*) were moderately informative, with PIC values between 0.25 and 0.05, and two other loci, (*Hanc54* and *Hanc30*) little informative (PIC < 0.25).

This set of loci revealed great applicability in studies of parentage and population differentiation, showing a high value of combined probability of paternity exclusion (0.999) and a very low value of genetic identity combined probability (1.4×10^{-5}).

Only one locus (*Hanc32*) showed significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), exhibiting the presence of null alleles inferred from excess homozygous genotypes, which could explain the observed deviation from HWE. After the sequential Bonferroni correction, the presence of linkage disequilibrium between any of the combinations of loci was not observed. Despite loci *Hanc06* and *Hanc32* being the only ones to present significant F_{IS} estimates, 0.174 and 0.280, respectively, the general population F_{IS} value was also significant (0.048). Considering that significant measures of F_{IS} are indicative of endogamy (Frankham *et al.*, 2010) and that *H. ancistroides* behaves as a sedentary species, the endogamy detected herein could be, at least in part, related to this behaviour of these fish, as suggest elsewhere (Zawadzki *et al.*, 2005; Sofia *et al.*, 2008).

The microsatellite loci showed good transferability in most species of Loricariidae tested, especially in the other six species of *Hypostomus* (Table II). In fact, in species of this genus, the number of polymorphic loci found varied from seven (*H. nigromaculatus*) to 13 (*H. hermanni*). The lower number of polymorphic loci found in *H. nigromaculatus* compared to other species of *Hypostomus* could be attributable to the lower number ($n = 2$) of individuals of this species used in the tests; for the other five species of this genus, five individuals were used to test microsatellite loci polymorphisms. Regarding the other Loricariidae genera, *P. ambrosettii* also showed polymorphism of all loci, while in *L. platymetopon* only two loci were polymorphic. In *C. aeneus*, the only species not belonging to the Lorariidae family, six from the 13 loci

tested showed polymorphism (Table II). The cross-transferability results are in accordance with other studies, which showed that microsatellite loci are more both likely to be amplified and show higher levels of polymorphisms in related species (Zaganini *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013; Souza-Shibatta *et al.*, 2013).

In conclusion, from the observed levels of polymorphism showed by this set of primers, it is possible to expect that they constitute promising tools for studies of *H. ancistroides* populations and other members of the Loricariidae family. Furthermore, since characterization of gene flow and genetic diversity is critical for conservation and management actions (Porto-Hannes & Lasker, 2013), the primers described in this paper should support future genetic conservation studies of this group of Neotropical fish.

Acknowledgments:

We are grateful to Fundação Araucária (Proc. n° 362/2012) and Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP) for their financial support to this study; to the Ministério do Meio Ambiente for granting permission to collect fish (n° 23315-1/SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade/Ministério do Meio Ambiente). Silvia Helena Sofia received research fellowships from CNPq (Proc. n° 306910/2012-8).

References

- Almeida, F. S., Pelegrinelli, M. H. & Sodré, L. M. K. (2001). RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. *Journal of Zoology* **253**, 113-120.
- Billotte, N., Lagoda, P. J, Risterucci, A. M. & Baurens. F. C. (1999). Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* **54**, 277–288.
- Botstein, D., White, L. R., Skolnick, M. & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32**, 314-331.
- Carvalho, G. R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology* **43**, 53-73.
- Casatti, L. (2002). Alimentação dos peixes em um riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do alto rio Paraná, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* **2**, 1-14.
- Costa, A. D. A., Ferreira, D. G., da Silva, W. F., Zanatta, A. S., Shibatta, O. A. & Galindo, B. A. (2013). Fishes (Osteichthyes: Actinopterygii) from the Penacho stream, upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. *Check List* **9**, 519-523.
- Cunico, A. M., Graça, W. J., Agostinho, A. A., Domingues, W. M. & Latini, J. D. (2009). Fish, Maringá urban streams, Pirapó river drainage, upper Paraná river basin, Paraná State, Brazil. *Check List* **5**, 273-280.

- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A. H., Soto, D., Stiassny, M. L. J. & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* **81**, 163–182.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.
- Ferraris, C. J. (2007). *Checklist of Catfishes, Recent and Fossil (Osteichthyes, Siluriformes), and Catalogue of Siluriform Primary Types*. Auckland: Magnolia Press.
- Ferreira, D. G., Galindo, B. A., Alves, A. N., Almeida, F. S., Ruas, C. F. & Sofia, S. H. (2013). Development and characterization of 14 microsatellite loci in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). *Journal of Fish Biology* **83**, 1430-1438.
- Frankham, R., Ballou, J. J. D. & Briscoe, D. D. A. (2010). *Introduction to Conservation Genetics*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press.
- Graça, W. J. & Pavanelli, C. S. (2007). *Peixes da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná e Áreas Adjacentes*. Maringá: EDUEM.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
- Hollanda Carvalho, P. (2011). *Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae)*. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

- Hurt, C. & Hedrick, P. W. (2004). Conservation genetics in aquatic species. General approaches and case studies in fishes and springsnails of arid lands. *Aquatic Sciences* **66**, 402–413.
- Langeani, F., Castro, R. M. C., Oyakawa, O. T., Shibatta, O. A., Pavanelli, C. S., Casatti, L. (2007). Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* **7**, 1-17.
- Lowe-McConnell, R. H. (1999). *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. São Paulo: Edusp.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. & Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639-655.
- Oliveira, D. C. D. & Bennemann, S. T. (2005). Ictiofauna, recursos alimentares e relações com as interferências antrópicas em um riacho urbano no sul do Brasil. *Biota Neotropica* **5**, 95-107.
- Oyakawa, O. T., Akama, A. & Zanata, A. M. (2005). Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from rio Ribeira de Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Zootaxa* **921**, 1-27.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. & Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* **4**, 347 – 354.
- Pazian, M. F., Leal, H. M. M. & Lalucce, M. (2011). Ichthyofaunal survey of the Riacho Goulart, tributary of the Tietê River (upper Paraná basin). *Check List* **7**. 652–655.
- Porto-Hannes, I., & Lasker, H. R. (2013). Isolation and characterization of 7 microsatellite loci in the Caribbean gorgonian *Antillogorgia elisabethae*. *Marine Biodiversity* **43**, 273–277.

- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rousset, F. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. J. (2000). Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (Krawetz, S. & Misener, S., eds), pp. 365 – 386. Totowa: Humana Press.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnologies* **18**, 223-234.
- Silva, J. V. & Hilsdorf, A. W. S. (2011). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). *Conservation Genetics and Molecular Research* **3**, 437–439.
- Smith, W. S., Petreire Jr, M. & Barrella, V. (2007). Fish, Sorocaba river sub-basin, state of São Paulo, Brazil. *Check List* **3**, 282-286.
- Sofia, S. H., Galindo, B. A., Paula, F. M., Sodr e, L. M., & Martinez, C. B. (2008). Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. *Genetics and Molecular Biology* **31**, 317-323.
- Souza-Shibatta, L., Ferreira, D. G., Oliveira, C., Almeida, F. S. D., Shibatta, O. A. & Sofia, S. H. (2013). Development and characterization of microsatellite loci of *Microglanis cottoides* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) and cross-species amplification. *Neotropical Ichthyology* **11**, 581-585.

- Strayer D. L. & Dudgeon D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society* **29**, 344–358.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* **15**, 199-203.
- Suzuki, H. I., Agostinho, A. A. & Winemiller, K. O. (2000). Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in loricariid catfishes of the Paraná River, Brazil. *Journal of Fish Biology* **57**, 791-807.
- Telles, M. P. C., Resende, L. V., Brondani, R. P. V., Collevatti, R. G., Costa, M. C. & Silva Júnior, N. J. (2010). Isolation and characterization of microsatellite markers in the armored catfish *Hypostomus gymnorhynchus* (Loricariidae). *Genetics and Molecular Research* **9**, 1770-1774.
- Vallone, M. V. & Butler J. M. (2004). AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques* **37**, 226-231.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. & Shipley, P. F. (2004). Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Weber, C. (2003) Subfamily Hypostominae (Armored catfishes). In *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris, C. J. Jr., eds), pp. 351-372. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Weir, B. S. (ed.) (1996). *Genetic Data Analysis II*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

- Zaganini, R. L., Hashimoto, D. T., Pereira, L. H. G., Oliveira, C., Mendonça, F. F., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2012). Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. *Journal of Genetics* **91**, 24-27.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* **11**, 1-16.
- Zawadzki, C. H., Renesto, E., dos Reis, R. E., Moura, M. O. & Mateus, R. P. (2005). Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica* **123**, 271-283.
- Zawadzki, C. H., Oliveira, R. R. D., & Debona, T. (2013). A new species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Tocantins-Araguaia basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **11**, 73-80.

Electronic References

- Wagner, H. W. & Sefc, K. M. (1999). *IDENTITY 1.0*. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna. Available at <http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>.

Tabela 1 - Description of 13 polymorphic microsatellite loci isolated from Neotropical armored catfish *Hypostomus ancistroides*. T_a = optimal annealing temperatures, k = number of alleles, allele size range (bp), H_o = observed heterozygosity, H_E = expected heterozygosity estimated from 30 individuals, Q = paternity exclusion probability, I = probability of genetic identity, F_{IS} = endogamy coefficient, PIC = polymorphic information content, GenBank accession numbers. *Significant Hardy-Weinberg Equilibrium deviation ($P < 0.05$).

Locus name	Sequence repeat	Primer sequences (5' - 3')	T_a (°C)	k	Allele size range (bp)	H_o	H_E	PIC	(Q)	(I)	F_{IS}	GenBank accession
Hanc01	(AC) ₇	F: CTGAAGGCTGGGAGTTTGAG R: ATCTCGTCAAACAGCACTCG	60	3	96 - 100	0.241	0.331	0.301	0.168	0.479	0.274	KF495020
Hanc02	(GT) ₇ (GA) ₁₇	F: CAGCACGATGGTGACCTG R: TCTGGGCTTTGCTTTTCATG	48	8	176 - 202	0.821	0.787	0.747	0.607	0.0686	-0.044	KF495021
Hanc06	(GT) ₂₈	F: AAGCCTCTAAGCTGTTAATGTGC R: AGCTCACATGAGACAGGAACC	48	10	132 - 174	0.679	0.819	0.779	0.643	0.0566	0.174*	KF495022
Hanc07	(CA) ₂₇	F: ACCCTTCATCACGCTGTCAT R: CTCAAGTGCGTATCCATCAG	48	15	93 - 131	0.897	0.897	0.871	0.765	0.024	0.0006	KF495023
Hanc09	(GT) ₆ (GA) ₈ (GT) ₅	F: AAGAAGATCATGATTAAGAAATGGTG R: ATGACTCAGTGCCGTCTGTG	48	3	102 - 130	0.483	0.420	0.372	0.212	0.385	-0.151	KF495024
Hanc12	(GT) ₁₈	F: TCTGAACACTCAGGCTGACAG R: TGAATGGGAAGTCCTATACCTG	48	12	172 - 220	0.607	0.621	0.593	0.457	0.148	0.022	KF495025
Hanc30	(CA) ₁₀	F: GATGGAAGCCTCAGCTGTTC R: CTGGTCCCTCCACATAGTCAGTG	54	2	146 - 148	0.172	0.160	0.145	0.072	0.722	-0.076	KF495026
Hanc32	(TG) ₂₁	F: AGGCGAGATACGAATTGCAG R: GCTCTCACTGCGTTCTTCTG	60	12	144 - 174	0.655	0.906*	0.880	0.777	0.022	0.280 [#]	KF495027
Hanc54	(TATG) ₅	F: TCAACACCGCAACACTACAG R: GCCTGTAAATGCTGCATCC	54	4	100 - 112	0.103	0.102	0.098	0.051	0.811	-0.018	KF495028
Hanc72	(CA) ₂₀	F: TTAGCAGGAATGGAAAGCAC R: GGTGAGGGCTATGTGTAGGTG	54	13	186 - 220	0.931	0.837	0.808	0.677	0.045	-0.115	KF495029
Hanc143	(GT) ₃₇	F: AATCGGTGAGGACTGTGACC R: CTGTGTCCAGCCTGTGATC	48	8	152 - 174	0.679	0.784	0.738	0.592	0.074	0.137	KF495030
Hanc184	(CA) ₁₀	F: CTGGACATCACAACCAGACC R: GCAAAGATAACAACGCTCTGC	54	7	168 - 224	0.448	0.464	0.435	0.277	0.316	0.034	KF495031
Hanc194	(TGG) ₃ (TG) ₇	F: TGGTGGATCATTCTCAGCAC R: GGTGGAAGGACATGACAGATG	54	2	176 - 158	0.552	0.503	0.372	0.186	0.377	-0.098	KF495032
All loci				7.62		0.559	0.587	0.549	0.999	1.4x10 ⁻⁵	0.048 [#]	

Tabela 2 - Cross-amplification of the 13 polymorphic loci in 13 species of Loricariidae and one species of Callichthyidae. N = sample size. The number in brackets represents the number of alleles.

N		Allele size range												
Species		Hanc01	Hanc02	Hanc06	Hanc07	Hanc09	Hanc12	Hanc30	Hanc32	Hanc54	Hanc72	Hanc143	Hanc184	Hanc194
<i>H. regani</i>	5	104-114 (3)	170-176 (3)	134-146 (2)	118 (1)	128-178 (5)	205-217 (5)	147 (1)	167-185 (3)	108 (1)	168 (1)	154-168 (4)	160-224 (4)	162 (1)
<i>H. strigaticeps</i>	5	97-107 (4)	172-174 (2)	130-160 (5)	0	128-180 (5)	187-215 (4)	146-154 (3)	164-180 (5)	108 (1)	185-225 (5)	146-198 (6)	164-180 (3)	162 (1)
<i>H. hermanni</i>	5	91-93 (2)	172-176 (2)	128-210 (8)	118-122 (2)	128-186 (8)	174-238 (9)	148-156 (5)	154-182 (7)	108-111 (2)	162-220 (6)	140-162 (6)	164-174 (3)	158-162 (2)
<i>H. albopunctatus</i>	5	93-101 (4)	172 (1)	136-158 (6)	101-137 (5)	128-168 (4)	168-264 (6)	148-232 (7)	172-218 (8)	108-116 (3)	192-226 (8)	140-238 (7)	166-236 (4)	162 (1)
<i>H. nigromaculatus</i>	2	95 (1)	172 (1)	126-136 (2)	0	132 (1)	230-274 (4)	174-256 (4)	200-248 (3)	108 (1)	210-226 (4)	150-152 (2)	230-252 (3)	162 (1)
<i>H.cf. topavae</i>	5	99-117 (4)	172-192 (3)	162-196 (9)	97-113 (2)	128-132 (2)	224-270 (6)	144 (1)	190-208 (6)	124 (1)	208-252 (9)	172-196 (6)	162-164 (2)	162 (1)
<i>Neoplecostomus yapo</i>	1	0	192-200 (2)	143 (1)	83 (1)	121 (1)	0	138 (1)	154 (1)	0	160 (1)	162 (1)	177-183 (2)	154 (1)
<i>Ancistrus cf. cirrhosus</i>	3	0	172-176 (2)	0	89-97 (2)	128-130 (2)	190 (1)	182-202 (4)	0	104-108 (2)	224-268 (2)	150-180 (3)	170-176 (2)	0
<i>Loricaria prolixa</i>	4	0	192-212 (3)	0	0	111 (1)	0	0	0	0	0	162-176 (3)	174-188 (4)	102-122 (2)
<i>Loricarichthys platymetopon</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	104-108 (2)	216 (1)	163-175 (2)	0	0
<i>Megalancistrus parananus</i>	5	0	225 (1)	155-166 (2)	107-123 (3)	133-139 (2)	186-188 (2)	153-155 (2)	177-181 (3)	104-108 (2)	0,0	183-195 (2)	164 (1)	162 (1)
<i>Pterygoplichthys ambrosettii</i>	5	91-93 (2)	189-231 (8)	117-159 (7)	114-142 (9)	148-164 (5)	174-212 (6)	155-179 (7)	141-173 (6)	104-124 (2)	139-163 (3)	142-174 (5)	188-222 (7)	160-162 (2)
<i>Rineleps aspera</i>	5	0	174 (1)	129-138 (2)	0	128-144 (5)	190-198 (2)	137-179 (5)	173-183 (3)	104-108 (2)	286-194 (2)	150-184 (6)	172-190 (2)	162-214 (2)
<i>Corydoras aeneus</i>	4	0	190-192 (2)	149-157 (3)	0	90 (1)	0	0	0,0	104-108 (2)	0	160-174 (3)	168-180 (3)	156-162 (2)

4.3 Capítulo 3

**ESTRUTURA GENÉTICA *Hypostomus ancistroides*,
(SILURIFORMES, LORICARIIDAE), EM UM RIO
NEOTROPICAL AMEAÇADO PELA IMPLANTAÇÃO DE
PEQUENAS CENTRAIS HIDRELÉTRICAS (PCHs)**

Este artigo será submetido à revista *Reviews in Fish Biology and Fisheries*

Estrutura genética *Hypostomus ancistroides*, (Siluriformes, Loricariidae), em um rio neotropical ameaçado pela implantação de Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs)

RESUMO

Dentre as principais ameaças antrópicas à ictiofauna da região Neotropical está a construção de usinas hidrelétricas. No presente estudo, a estrutura e diversidade genética de populações de *H. ancistroides*, amostradas em sete pontos, abrangendo desde a nascente até a foz de um rio com extensão de 350 km, foram analisadas com base em marcadores nucleares (microsatélites) e mitocondriais (região *D-loop*). Os resultados obtidos com ambos os tipos de marcadores revelaram uma estruturação genética significativa das populações de *H. ancistroides* ao longo do rio em dois grandes grupos e uma correlação positiva entre distância genética e distância geográfica. Foram encontradas três linhagens haplotípicas diferentes para o DNA mitocondrial analisado, com as distâncias entre as diferentes linhagens variando de 2,4% a 3,4%, o que evidencia que hoje habitam em simpatria haplótipos oriundos de indivíduos que se diferenciaram em locais diferentes ao longo da história evolutiva da espécie. Ainda, foi observado que as populações do rio mantêm bons níveis de diversidade genética. Tais informações devem servir de base para um monitoramento da diversidade genética da espécie ao longo deste rio.

Palavras-chave: *diversidade genética, marcadores moleculares, genética de populações, linhagens haplotípicas.*

1 INTRODUÇÃO

Na América do Sul, a bacia do rio Paraná, que constitui a segunda maior bacia hidrográfica da região Neotropical, é amplamente reconhecida por sua alta diversidade de peixes (LANGEANI et al., 2007; LÉVÊQUE et al., 2008). Contudo, assim como acontece com vários outros sistemas hidrográficos dos neotrópicos, os rios desta bacia estão sob intensa e frequente ameaça de interferência antrópica, que colocam em risco a biodiversidade da ictiofauna e de outros organismos aquáticos (NILSSON et al., 2005; BARLETTA et al., 2010). Dentre as principais ameaças antrópicas aos rios, particularmente aos de médio e grande portes, está a implantação de usinas hidrelétricas (UHE), que se proliferam de maneira alarmante pelos rios das diferentes bacias hidrográficas neotropicais. De fato, o barramento dos rios pela construção de barragens, principalmente para fins hidrelétricos, são reconhecidos por diversos autores como uma das principais ameaças à biodiversidade de água doce (VRIJENHOEK, 1998; AGOSTINHO, THOMAZ e GOMES, 2005; DUDGEON et al., 2006; LÉVÊQUE et al., 2008; GEIST, 2011).

Atualmente no Brasil existem em operação 1.090 empreendimentos hidrelétricos em operação, destes 433 são Centrais Geradoras Hidrelétrica (CGH - com até 1 MW de potência instalada) , 462 são Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCH - entre 1,1 MW e 30 MW de potência instalada) e 195 são Usinas Hidrelétricas (UHE - com mais de 30 MW), este número aumentará consideravelmente nos próximos anos pois encontram-se em construção outros 39 empreendimentos (1 CGH, 31 PCH e 7 UHE) e 208 projetos já foram outorgados (53 CGH, 140 PCH e 15 UHE) (BIG, 2013; ANEEL, 2008). No caso particular da bacia do rio Paraná, existem pelo menos 146 grandes represamentos na bacia, destes 70% destinados à geração de hidroeletricidade (AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007).

Os impactos causados pelos barramentos, tais como transformação de ambientes lóticos em lênticos, alterações nos ciclos de inundação, perda de lagoas marginais e fragmentação do ambiente combinados podem causar mudanças na estrutura genética e no tamanho das populações, levando à redução ou mesmo perda de variabilidade genética (GARCEZ, CARCAGNOTTO e ALMEIDA-TOLEDO, 2011).

O conhecimento da estruturação populacional de uma espécie em particular é fundamental para o estabelecimento de Unidades Evolutivas Significativas, que pode conservar a integridade genética e pode ser usada por ecologistas no futuro. Deste modo, os marcadores de DNA são extremamente úteis para o desenvolvimento de planos de manejo mais adequado para populações naturais de peixes neotropicais (PIORSKI, 2008)

Os diversos marcadores genéticos atualmente disponíveis permitem um acesso rápido à variabilidade genética intra e interpoblacional, possibilitam o estudo de estruturação populacional, análise de parentesco e identificação de indivíduos e espécies semelhantes. Desta forma, os marcadores de DNA são extremamente úteis para o desenvolvimento de planos de manejo mais adequados para populações naturais de peixes neotropicais (PIORSKI, 2008). Dentre estas técnicas os microssatélites e *D-loop*, vem se destacando na detecção de variabilidade do genoma nuclear e mitocondrial respectivamente, especialmente em peixes como pode-se observar em uma ampla revisão feita por Oliveira, Foresti e Hilsdorf (2009).

O DNA mitocondrial (mtDNA) possui algumas particularidades em relação ao DNA nuclear (nDNA), por exemplo, com raras exceções este DNA é herdado exclusivamente do parental materno, além de possuir natureza haploide, ou seja, o indivíduo possui apenas um único “tipo”, haplótipo, de genoma mitocondrial. Considerando o tamanho efetivo populacional, o genoma mitocondrial é cerca de um quarto do tamanho do genoma nuclear, que é herdado de ambos os parentais diploides, este fato faz deste marcador muito mais sensível à deriva genética do que o nDNA. A taxa de evolução geral do mtDNA é cerca de uma ordem de magnitude maior do que uma gene de cópia simples do DNA nuclear. Considerando o DNAm_t, a região controladora não codificante conhecida como *D-loop*, é muito mais variável do que as regiões codificantes, o que a torna adequada para estudos populacionais (FREELAND, 2005; WARD, 2002). A região *D-loop*, vem sendo empregada com grande eficiência em estudos populacionais, filogeográficos e filogenéticos de peixes (MONTROYA-BURGOS, 2003; CARDOSO et al., 2011; AGUIRRE-PABÓN, BARANDICA e GARCÍA, 2013).

Por outro lado, marcadores nucleares, codominantes e multialélicos como os microssatélites (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995), são de longe os marcadores

mais empregados atualmente em estudos populacionais de peixes (PIORSKI et al., 2008). Os microssatélites, são repetições em tandem geralmente de 1 a 5 bases (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010), sua variabilidade tem origem na variação no número de repetições, que determina diferença no tamanho dos alelos, além disso, em geral são seletivamente neutros e possuem uma taxa mutação muito alta, podendo gerar dezenas de alelos por locos (WARD, 2002). A principal dificuldade apontada para o uso destes marcadores, é a necessidade de se desenvolver iniciadores específicos para a espécie ou para um grupo de espécies (WARD, 2002; PIORSKI et al., 2008).

A alteração dos habitats pela construção de barramentos constituem a principal fonte impactante, tanto sobre espécie migradoras como sobre as espécies não migradoras (AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007; AGOSTINHO et al., 2007). Entretanto, quando se objetiva estudar a influência de barramentos, a maioria dos estudos genéticos de peixes envolvem espécies migradoras (LOPES et al., 2007; CARVALHO-COSTA, HATANAKA e GALETTI JR, 2008; GARCEZ, CALCAGNOTTO e ALMEIDA-TOLEDO, 2011; RAMOS et al, 2012; GOMES et al., 2013). As espécies não migradoras são aquelas capazes de realizar todas as atividades vitais em uma área restrita da bacia (AGOSTINHO, GOMES E PELICICE, 2007) e juntamente com migradores de curta distância representam 88% da ictiofauna do alto rio Paraná. Apesar de sua importância, pouco se tem estudado sobre a diversidade e estrutura genética das populações de espécies não migradoras ao longo de um corpo d'água (LEUZZI et al, 2004; SOFIA et al., 2006; SOFIA et al., 2008). Tal conhecimento sobre espécies não migradoras torna-se de particular interesse, uma vez que populações destas espécies estariam mais sujeitas a perda de diversidade devido a processos endogâmicos (ZAWADZKI et al., 2005; SOFIA et al., 2008), ainda, estudos em uma escala maior, com populações distribuídas da nascente à foz de um rio ainda são escassos.

Hypostomus ancistroides (Ihering, 1911), é uma espécie de siluriforme neotropical que varia de pequeno a médio porte, que é amplamente dispersa pela bacia do Alto rio Paraná. Trata-se uma espécie não migradora, com fecundação externa e cuidado parental (AGOSTINHO et al., 2007; ORSI, 2010). Possui hábito alimentar perifitívoro, alimentando-se principalmente de diatomáceas, clorofíceas e matéria

orgânica, começando sua atividade de forrageio no início da noite, principalmente junto às margens, sobre galhos e troncos submersos (CASATTI, 2003), destes, detritos de madeira parecem ser o substrato utilizado preferencialmente pela espécie (CASATTI, 2003; CASATTI, 2004; CASATTI, 2005). *Hypostomus ancistroides* também apresenta grande plasticidade, ocorrendo desde os trechos superiores de rios e riachos até os trechos mais à jusante, outra particularidade é que sua ocorrência é registrada tanto em ambientes com melhor integridade ambiental, até ambiente com alta incidência de impactos antrópicos, (CASATTI, 2003; CASATTI, 2004; CASATTI, 2005), ou até mesmo em ribeirões urbanos (VIEIRA e SHIBATTA, 2007; SOFIA et al., 2008).

O fato de sua preferência por riachos, o hábito sedentário da maioria das espécies de *Hypostomus* e sua ampla distribuição pela bacia, faz da muitas populações de *H. ancistroides* propensa a exibir algum grau de divergência genética de outras populações coespecíficas (ENDO et al., 2012). Sofia e colaboradores (2008) analisando *H. ancistroides* em um ribeirão pôde constatar baixa níveis de diversidade genética e altos índices de estruturação, no entanto, este trabalho foi conduzido em uma escala bastante reduzida, e estudos populacionais de *H. ancistroides* uma escala maior utilizando marcadores mais informativos como microssatélites ainda não existem.

No presente trabalho, marcadores microssatélites e mitocôndriais (região *D-loop*), foram empregados para a análise da diversidade e estrutura genética de populações de *H. ancistroides* distribuídas da nascente a foz de um rio, severamente ameaçado pela implantação de usinas hidrelétricas em um futuro próximo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Espécie estudada

A espécie *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) (Figura 01) é uma das diversas espécies conhecidas popularmente como “cascudos”. Pertence à ordem Siluriformes, família Loricariidae e subfamília Hypostominae. Os Siluriformes, em geral, possuem hábitos bentônicos e noturnos, possuem o corpo nu, sem escamas, ou recobertos por placas ósseas, como é o caso dos membros da subfamília Loricariidae, nesta família as placas ósseas possuem dentes dérmicos denominados odontodes. Possuem a boca em posição ventral e bexiga natatória reduzida e envolvida por uma cápsula óssea ligada à parte posterior do crânio. A subfamília Hypostominae diferencia-se da subfamília Loricariinae principalmente por apresentar o pedúnculo caudal alto e não achatado como nestes últimos (BRITSKI, SILIMON e LOPES, 2007). A família Loricariidae é a maior família de Siluriformes da região Neotropical e do mundo (REIS, KULLANDER e FERRARIS JR, 2003). A subfamília Hypostominae possui muitas espécies nominais com status taxonômico incerto, especialmente no gênero *Hypostomus*, devido provavelmente à alta variabilidade intraespecífica na morfologia e padrões de coloração que podem ter sido mal interpretadas e induzido os autores a descreverem novos táxons (WEBER, 2003). Ainda segundo Weber (2003) o gênero *Hypostomus* é o mais especioso da família com mais de 100 espécies, em consulta à base de dados FishBase (FROESE e PAULY, 2013) em 06 de setembro de 2013 haviam 133 espécies válidas para o gênero.



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

Hypostomus ancistroides, originalmente descrita para o rio Tatuhy, bacia do rio Tietê (WEBER, 2003), atualmente tem sua ocorrência registrada para a bacia do Alto rio Paraná, bacia do rio Tietê e bacia do rio Ribeira do Iguape (ESCHMEYER, 2014). *Hypostomus ancistroides*, ocorre desde ribeirões (CASTRO et al., 2003; CASTRO et al., 2004; CASATTI, 2005; COSTA et. al, 2013), calha principal de rios (GRAÇA e PAVANELLI, 2007; SHIBATTA, GEALH e BENNEMANN, 2007) e até em reservatórios (BRITTO e CARVALHO, 2006), desta maneira constitui uma excelente opção para se estudar a distribuição da diversidade genética ao longo de uma bacia, bem como monitorar possíveis efeitos de barramentos sobre esta distribuição.

2.2 Local de estudo

As amostragens foram realizadas no rio Laranjinha, no sul do Brasil. Com 350 km de extensão, o rio Laranjinha constitui o principal afluente do rio das Cinzas, tributário da bacia do rio Paranapanema, o qual faz parte do sistema do Alto rio Paraná. Atualmente, o rio Laranjinha possui apenas um pequeno barramento construído no final da década de 50 para servir à uma Pequena Central Hidrelétrica (PCH), entretanto, esta PCH jamais entrou em operação devido à problemas técnicos. No restante de sua grande extensão, o rio Laranjinha possui várias corredeiras e paredões rochosos, exibindo diversos ambientes de águas rápidas. Entretanto, este panorama pode mudar drasticamente nos próximos anos, pois o Relatório de Acompanhamento de Estudos e Projetos de Usinas Hidrelétricas de 18/10/2013 publicado pela ANEEL (Agência Nacional de Energia Elétrica) aponta seis registros de projetos para o rio Laranjinha e outros quatro para o rio das Cinzas. Dentre estes registros dois já foram outorgados pela ANEEL para o rio Laranjinha e um para o rio das Cinzas (BIG, 2013).

2.3 Coleta dos exemplares

Foram demarcados sete trechos de coleta ao longo do rio Laranjinha, partindo de sua nascente em direção à sua foz (Figura 2 e Tabela 1). Em cada ponto, foram realizadas seis coletas, no período de outubro de 2010 à julho de 2013. A captura dos indivíduos foi realizada com o auxílio de redes de espera de malhas variadas, peneiras e tarrafas (Autorização nº 23315-1 MMA/ICMBio/SISBIO). Os indivíduos coletados, foram acondicionados em gelo e no Laboratório de Genética e Conservação da UENP

(Universidade Estadual do Norte do Paraná), estes foram triados, identificados e tiveram amostras de músculo e nadadeira preservada em etanol 95% à -20°C. Exemplares testemunho foram fixados em formol 10% e, posteriormente, transferidos para etanol 70% e tombados na CIUENP (Coleção Ictiológica da UENP) e no MZUEL (Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina). Além disso, todos os exemplares utilizados nas análises foram preservados em formol 10% na CIUENP.

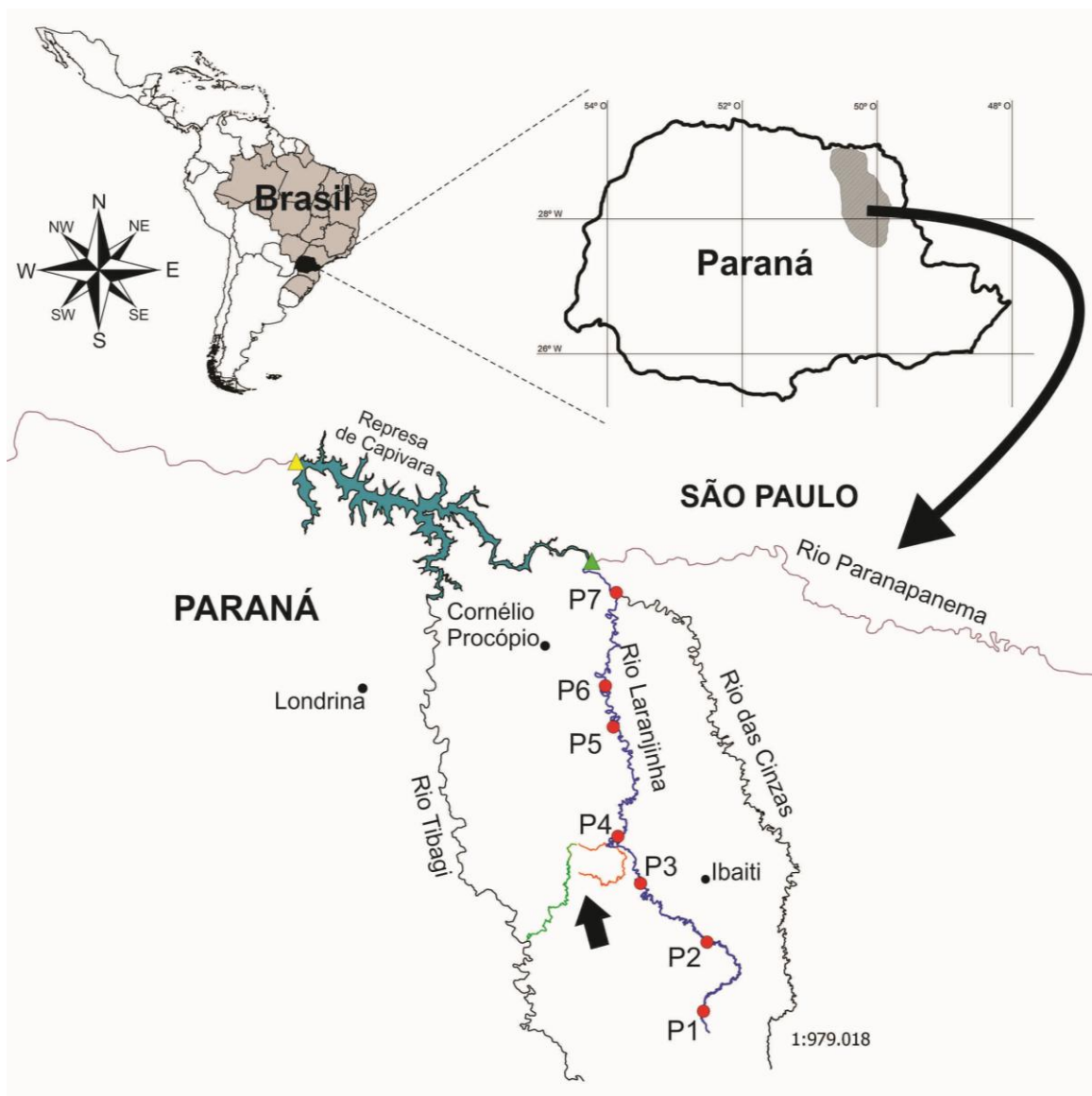


Figura 2 – Mapa dos trechos de coleta no rio Laranjinha. Círculos vermelhos representam os trechos de coleta. Triângulo amarelo representa a UHE Capivara e o triângulo verde UHE Canoas I. Seta indica o rio Lageado Liso (amarelo), afluente do rio Tibagi, e afluentes do rio Laranjinha (laranja).

Um total de 215 indivíduos foram utilizados nas análises genéticas (Tabela 1) com uma média superior a 30 indivíduos por trecho amostral.

Tabela 1 – Trechos de coleta distribuídos ao longo do rio Laranjinha, sendo Ventania o trecho mais próximo à nascente e Foz o trecho mais próximo à foz. N = número de indivíduos utilizados nas análises genéticas por trecho de coleta, Cód = código do trecho amostral

Trecho de Coleta	Cód	N	Coordenadas Geográficas	Distância em relação a foz
Ventania	P1	31	24°13'24,56"S / 50°11'57,88"O	348,87 km
Moquém	P2	30	24° 01'36,6"S / 50°11'21,6"O	278,34 km
Figueira	P3	28	23°51'34,73"S / 50°22'43,04"O	214,9 km
Ibaiti	P4	30	23°43'31,88"S / 50°26'34,42"O	173,19 km
Barragem	P5	39	23°24'53,06"S / 50°27'8,60"O	98 km
Santa Amélia	P6	24	23°17'49,95"S / 50°28'43,27"O	59,7 km
Foz	P7	33	23° 1'53,90"S / 50°26'51,90"O	0 km

2.4 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada por dois protocolos diferentes, um baseado em lavagens de fenol e clorofórmio (ALMEIDA, FUNGARO E SODRÉ, 2001) e um segundo baseado em lavagens com sal (LOPERA-BARRERO et al., 2008). A concentração do DNA foi obtida em fluorímetro Qubit (Invitrogen) com o kit comercial QUANT-IT DSDNA BR (Invitrogen). As amostras foram diluídas à uma concentração padrão de 5 ng/ μ L.

2.5 Análise de Microssatélites

Até o presente não haviam *primers* específicos descritos para *H. ancistroides*, entretanto, um novo conjunto de 13 *primers* foi descrito por Galindo e colaboradores (capítulo 2, presente tese) para a espécie. Destes 12 foram selecionados para as análises populacionais (Hanc 01, Hanc 02, Hanc 06, Hanc 07, Hanc 09, Hanc 12, Hanc 32, Hanc 54, Hanc 72, Hanc 143, Hanc 184, Hanc 194).

O *primer* F de cada par foi modificado pela adição da sequência universal M13(-21) de 18 nucleotídeos (5'-TGTAACAACGACGGCCAGT- 3') na região 5', este procedimento foi utilizado para marcação dos produtos de PCR com fluoróforos, que

estão ligados a um terceiro *primer* utilizado na reação, o *primer* M13-marcado (FAM, NED ou HEX), este procedimento foi proposto por Schuelke (2000) e possibilita a genotipagem automatizada em sequenciadores.

As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 5 μ l contendo com as seguintes concentrações de reagentes: 1x Go Taq® Green Master Mix (PROMEGA); 0,125 μ M *primer* R, 0,0125 μ M *primer* F+M13, 0,125 μ M *primer* M13 marcado com fluoróforos (FAM, HEX ou NED, Applied Biosystems, CA), 1% glicerol, 5ng DNA molde e água “*nuclease free*” para completar volume. As condições do termociclador foram ajustadas para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 10 ciclos com 30 segundos a 94°C, 1 minuto (48°C: Hanc 02, Hanc 06, Hanc 07, Hanc 09, Hanc 12, Hanc 143; 54°C: Hanc 54, Hanc 72, Hanc 184; Hanc 194; 60°C: Hanc 01, Hanc 32), 1 minuto a 72°C; em seguida, mais 25 ciclos consistindo de: 30 segundos a 89°C, 1 minuto na temperatura de anelamento de cada *primer* e 1 minuto a 72°C; finalmente uma extensão final de 30 minutos a 72°C. Os produtos de PCR marcados foram diluídos da seguinte maneira: em 9 μ L de água “*nuclease free*” adiciona-se 2 μ L do produto de PCR marcado com cada fluoróforo (FAM, HEX e NED) totalizando 15 μ L. Em cada poço da placa de sequenciamento utiliza-se 8 μ L de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, CA), 0,1 μ L do marcador de peso molecular GeneScan LIZ 600 (Applied Biosystems, CA) e 2 μ L do produto de PCR marcado e diluído. Estas placas foram colocados em sequenciador automático (Genetic Analyzer – modelo: 3500XL/ Applied Biosystems) para genotipagem. Os picogramas gerados foram analisados manualmente pelo programa GeneMarker v.1.85.

Para as análises de diversidade genética foram estimados ou calculados alguns parâmetros, dentre eles: proporção de locos polimórficos (\bar{P}), o número de alelos (N_a), número de alelos efetivos (N_e), Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e), Diversidade Genética de Nei (1973) (H_s) através do programa POPGENE v. 1.32 (YEH et al., 2000); a riqueza alélica foi estimada pelo software FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET, 2002), o programa GenAlEx v. 6.4 (PEAKALL e SMOUSE, 2006) foi utilizado para estimativa de alelos privados (N_p), alelos com frequência superior a 5% ($N_{a_{f>5\%}}$). O Equilíbrio de Hardy-Weinberg por locus e por população, e o desequilíbrio de ligação para cada par de loci em cada população foi calculado pelo programa GENEPOP v. 1.2 (RAYMOND e ROUSSET, 1995) e os

valores de significância (valor de P) foram ajustados pela correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989). Os erros de genotipagem devido a presença de alelos nulos, alelos *dropout* e picos *stutter* foram checados pelo programa MICRO-CHECKER v. 2.2.1 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). O programa BOTTLENECK v. 1.2.02 (CORNUET e LUIKART, 1996) foi utilizado para verificar evidências de possíveis reduções recentes no tamanho populacional das amostras, para tanto foram utilizados os diferentes modelos de evolução para microssatélites *Infinite alleles Model* (IAM), *Stepwise Mutation Model* (SMM) e *Two-Phase Model* (TPM) este último considerando 90% SMM e 10% IAM, o nível de significância foi avaliado pelo teste de Wilcoxon considerando $P < 0,05$.

O programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (EXCOFFIER et al., 2010) foi empregado na análise da variância molecular (AMOVA), utilizada para estimar os componentes da variação genética dentro e entre as amostras, para calcular a estruturação genética entre as amostras por meio do índice F_{ST} (WEIR e COCKERHAM, 1984), que leva em consideração o modelo IAM, e também pelo índice R_{ST} (SLATKIN, 1995) que assume o modelo SMM, nestas situações o teste de significância foi realizado a partir de 10.000 permutações.

Um dendrograma de similaridade genética foi construído pelo programa TFPGA v. 1.3 (MILLER, 1997) utilizando o método de agrupamento UPGMA e tendo como parâmetro a distância genética de Nei (1978) com 1.000 permutações de *bootstrapping* para testar a confiabilidade dos nós, evidenciando a proporção de réplicas similares à topologia original.

O programa STRUCTURE v.2.3.3 (PRITCHARD, STEPHENS, e DONNELLY, 2000) foi utilizado para verificar a relação das amostras a partir de agrupamentos bayesianos. O modelo *admixture* que assume que os indivíduos podem ter ancestralidade mista possuindo contribuições genotípicas de diferentes populações (PRITCHARD, STEPHENS, e DONNELLY, 2000) foi utilizado na análise. As estimativas do número de populações (K) foram realizados em simulações de 1 a 10 (número de amostras + três), reproduzindo 20 corridas para cada valor de K segundo Evanno, Raganaut e Goudet (2005), com 10.000 interações no *burn-in* e 100.000 interações na Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). As ordenações dos resultados e

inferência do K mais provável estatisticamente, utilizando a estatística ΔK (EVANNO, REGNAUT e GOUDET et al., 2005) foram realizadas pelo aplicativo STRUCTURE HARVESTER 0.6.93 (EARL, 2012)

Por fim, uma estimativa bayesiana de fluxo gênico foi realizada pelo programa BAYESASS 1.3 (WILSON e RANNALA, 2003).

2.6 Análise do *D-loop*

A análise do DNA mitocondrial foi realizada por meio da amplificação parcial da região *D-loop* baseado em Cardoso et al (2011) utilizando os *primers* DLA-III: 5' TATTTAAAGRCATAATCTCTTGAC 3' e HygDL-R: 5' WTGCKARTATGTGCCGYTGTG 3', que haviam amplificado esta mesma região para outra espécie do gênero. As amplificações iniciais foram realizadas em reações de 25 μ L contendo 1x Go Taq® Green Master Mix (PROMEGA), 0,5 μ M de cada *primer*, 15ng de DNA molde e água “*nuclease free*” para completar volume. As condições do termociclador foram ajustadas para uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguida por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 2 minutos a 72°C, por fim uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Este produto de PCR foi purificado pela enzima Illustra™ ExoStar 1-Step (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. As reações de sequenciamento de cada filamento do DNA foram realizadas separadamente utilizando o kit BigDye Terminator™ kit (v.3.1–Applied Biosystems), 0,5 μ M de *primer*, 1 μ L do produto de PCR previamente purificado e seguindo as demais orientações do fabricante.

Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados por precipitação com EDTA e etanol, para isto foram adicionados 5 μ L de EDTA 125 Mm e 60 μ L de etanol absoluto em cada poço, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e depois centrifugadas por 45 minutos a 3.450 rpm a 14°C, o sobrenadante foi despresado e adicionado mais 60 μ L de etanol 70%, e as placas foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.450 rpm a 14°C, o sobrenadante foi novamente despresado e as placas foram centrifugadas invertidas por 1 minuto a 1.000 rpm a 14°C para eliminar todo resíduo de etanol. Em seguida, foram adicionados 10 μ L Formamida

Hi-Di (Applied Biosystems, CA) e então as amostras foram submetidas à um choque térmico, colocadas em termociclador 95°C por 5 minutos, após este tempo foram imediatamente colocadas em gelo e finalmente levados ao seqüenciador automatizado (Genetic Analyzer – modelo: 3500XL / Applied Biosystems).

O aplicativo *Electropherogram Quality Analysis* (TOGAWA e BRIGIDO, 2003), acessado em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> foi utilizado para a análise de qualidade das sequências e geração dos *contigs*, estes foram alinhados no programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999) por meio do aplicativo Clustal W (THOMPSON, 1994), depois de alinhados, todas as mutações foram checadas manualmente por meio do software DNA Baser v. 3.5.5.216 (Heracle BioSoft SRL). Na página do NCBI – *National Center for Biotechnology Information*, acessada em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, as sequências foram submetidas à uma busca no aplicativo BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1990) para confirmação de sequenciamento da região de interesse, as sequências também foram submetidas à uma busca no programa on-line tRNAscan-SE (LOWE e EDDY, 1997) disponível no sítio: <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/> para checar a existência de RNA transportador.

Os cálculos do número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (Pi), a determinação dos haplótipos, frequência haplotípica, partição da diversidade genética pelo cálculo da AMOVA, estruturação populacional pelo Fst par a par, os testes de neutralidade seletiva de Tagima (D) e Fu (Fs) foram calculados pelo programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (EXCOFFIER et al., 2010).

A rede de haplótipos baseada no algoritmo *median-joining* (BANDELT et al., 1999), foi gerada no programa Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd - <http://www.fluxus-engineering.com>)

O programa MEGA 5.2 (TAMURA et al., 2011) foi utilizado para se estimar a distância genética dentro e entre as linhagens e construir árvores à partir dos análises de Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV). O mesmo software foi empregado na escolha do modelo de evolução nucleotídica mais provável considerando o menor escore para Critério de Informação Bayesiana (BIC), seguido pelo maior escore de Critério de Informação de Akaike Corrigido (AICc). As

árvores de NJ, MP e MV foram construídas tanto utilizando todos os indivíduos analisados (215 exemplares), como utilizado apenas uma sequência para cada haplótipo, utilizando 1.000 pseudoréplicas de *bootstrapping* como teste estatístico de cada nó.

Tomando por base a biogeografia do gênero *Hypostomus* (MONTROYA-BURGOS, 2003) as espécies *H. commersoni* (gi|343488882) e *H. affinis* (gi|27124594) foram escolhidas para enraizar as árvores, suas sequências de *D-loop* foram obtidas na página do GenBank e alinhadas manualmente.

3 RESULTADOS

3.1 Diversidade Genética

Microsatélites

Com exceção do loco Hanc 54 que foi polimórfico apenas na amostra da população P7, os demais *primers* foram polimórficos em todas as populações. Contabilizando os 215 indivíduos analisados, os doze *primers* de microsatélites produziram 164 alelos, com médias de 13,7 alelos por loco e 90,6 alelos por população. O número de alelos por loco variou de três (loco Hanc 01) até 24 (Hanc 12), enquanto o número de alelos por população variou de 74 (P1) até 101 a (P5). A amostra P1, que é o ponto localizado mais próximo à nascente do rio, apresentou os menores valores de diversidade genética, incluindo: número médio de alelos ($N_a = 6,17$), número efetivo de alelos ($N_e = 3,26$), número de alelos com frequência superior a 5% ($N_{af>5\%} = 40$), riqueza alélica média ($R_A = 5,63$), heterozigosidade observada ($H_O = 0,5522$), heterozigosidade esperada ($H_e = 0,5560$); de modo diverso, as amostras localizadas na porção baixa do rio apresentaram os maiores índices de diversidade, com P4 apresentando os maiores valores de $N_{af>5\%} = 60$ e $H_O = 0,6806$, P5 mostrando a maior média de alelos por loco (8,42), P6 os maiores valores de $N_e = 4,79$, $R_A = 7,70$ e $H_e = 0,6474$ e, por fim, a amostra P7 (próxima à foz do rio) com o maior número de alelos privados (13). De modo distinto das demais, a amostra P2 não apresentou alelos privados (Tabelas 2 e 3).

O coeficiente de endogamia (F_{IS}) apresentou valores significativos apenas em alguns locos para algumas amostras: P1 (loco Hanc 143), P5 (Hanc 06), P6 (Hanc 194) e P7 (locos Hanc 06 e 32). Entretanto, para o conjunto de locos analisados por amostra não foram evidenciados valores significativos de F_{IS} (Tabelas 2 e 3).

Alguns locos mantiveram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) mesmo após a correção sequencial de Bonferroni, são estes: Hanc 09 (amostras P1, P2, P3, P4 e P5), Hanc 32 (amostras P1, P5 e P7) e Hanc 194 (amostra P6) (Tabelas 2 e 3). Nenhuma das sete amostras apresentou indicativos de erros de genotipagem devido à presença de “*bandas stutters*” ou “*large allele dropout*”, entretanto, as amostras P6 e P7 apresentaram indicativo da presença de alelos nulos, respectivamente, para os loci Hanc 194 e 32. Apenas duas amostras apresentaram pares de *primers* em desequilíbrio de ligação após a correção sequencial de Bonferroni, na amostra P1 (Hanc 02 x Hanc 184, Hanc 06 x Hanc 72, Hanc 32 x Hanc 143, Hanc 32 x Hanc 184) e P4 (Hanc 06 x Hanc 194).

Tabela 2 – Parâmetros genéticos estimados para as sete amostras (P1 a P7) de populações de *Hypostomus ancistroides* do rio Laranjinha, no sul do Brasil, analisadas por meio dos marcadores de microssatélites. N – número de indivíduos analisados; Na – número de alelos; Ne – número de alelos efetivos; Np – número de alelos privados; N_{af >5%} - número de alelos com frequência acima de 5%; R_A – riqueza alélica; Ho – heterozigotidade observada; He – heterozigotidade esperada; F_{IS} – índice de endogamia (*P < 0,05), EHW – teste de significância para possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor de P < 0,05 após a correção sequencial de Bonferroni considerando $\alpha = 0,05$).

Amostras (P1 a P7)	N	Locos											Todos locos	
		Hanc01	Hanc02	Hanc06	Hanc07	Hanc09	Hanc12	Hanc32	Hanc54	Hanc72	Hanc143	Hanc184		Hanc194
P1	31													
Na/Ne		2/1,07	6/2,37	11/5,90	8/5,57	3/2,25	6/3,19	9/2,89	1/1	7/4,63	13/6,91	4/1,26	4/2,11	6,17/3,26
Np/ Na _{E>5%}		0/1	0/3	2/6	0/6	0/3	0/4	0/3	0/1	0/5	2/5	1/1	1/2	6/40
R _A		1,919	5,666	9,747	7,623	2,995	5,688	7,677	1,000	6,419	11,632	3,667	3,467	5,63
Ho		0,0645	0,5806	0,8387	0,9032	0,8065	0,7419	0,5484	0	0,8065	0,7419	0,1613	0,4333	0,5522
He		0,0635	0,5880	0,8440	0,8340	0,5653	0,6975	0,6653	0	0,7969	0,8694	0,2115	0,5362	0,5560
F _{IS}		-0,0169	0,0128	0,0064	-0,0846	-0,4368	-0,0648	0,1781	N,A	-0,0121	0,1487*	0,2405	0,1944	0,0037
EHW		1,0000	0,0964	0,2669	0,2188	0,0008*	0,9247	0,0000*	No info.	0,3153	0,1010	0,1898	0,0167	
P2	30													
Na/Ne		2/1,03	7/4,58	9/5,86	9/6,62	4/2,60	9/3,16	9/5,22	1/1	8/3,51	14/6,43	3/1,26	2/1,89	6,41/3,60
Np/ Na _{E>5%}		0/1	0/5	0/7	0/7	0/4	0/5	0/7	0/1	0/6	0/7	0/2	0/2	0/54
R _A		1,733	6,848	8,633	8,664	3,995	8,298	8,656	1,000	7,645	12,693	2,733	2,000	6,07
Ho		0,0333	0,8667	0,9000	0,8667	1	0,7667	0,7333	0	0,7333	0,8333	0,2333	0,5517	0,6265
He		0,0333	0,7949	0,8435	0,8633	0,6266	0,6955	0,8220	0	0,7271	0,8588	0,2130	0,4791	0,5798
F _{IS}		-0,0000	-0,0920	-0,0682	-0,0040	-0,6126	-0,1043	0,1096	N.A.	-0,0087	0,0301	-0,0973	-0,15464	-0,0845
EHW		No info.	0,6406	0,9137	0,5897	0,0000*	0,5797	0,0985	No info.	0,5139	0,5231	1,0000	0,4550	
P3	28													
Na/Ne		3/1,07	9/5,19	11/5,46	13/7,13	4/2,69	12/6,10	13/6,70	1/1	6/3,65	16/10,20	3/1,97	2/1,77	7,75/4,41
Np/ Na _{E>5%}		0/1	3/5	0/6	1/9	0/4	1/7	0/9	0/1	0/4	0/8	0/3	0/2	5/59
R _A		2,571	8,656	10,270	12,280	3,992	10,912	12,463	1,000	5,743	15,118	2,992	2,000	7,33
Ho		0,0714	0,8214	0,7143	0,8214	0,9286	0,8571	0,8214	0	0,8571	0,8889	0,4643	0,5000	0,6455
He		0,0708	0,8221	0,8318	0,8753	0,6396	0,8513	0,8662	0	0,7390	0,9189	0,5006	0,4442	0,6300
F _{IS}		-0,0093	0,0008	0,14354	0,0626	-0,4640	-0,0070	0,0526	N.A.	-0,1634	0,0333	0,0739	-0,12836	-0,0298
EHW		1,0000	0,6287	0,0519	0,2365	0,0001*	0,6517	0,1534	No info.	0,1885	0,3916	0,8556	0,6702	

P4	30													
Na/Ne		2/1,10	9/5,11	13/5,45	11/6,08	4/2,52	11/5,86	14/8,29	1/1	9/5,36	15/9,33	4/1,77	2/1,72	7,92/4,47
Np/ Na _{F>5%}		0/2	1/6	0/7	0/7	0/4	0/5	0/8	0/1	0/7	0/8	0/3	0/2	1/60
R _A		1,984	8,394	11,764	10,111	3,980	10,194	12,956	1,000	8,443	13,891	3,717	2,000	7,37
Ho		0,1000	0,9000	0,8000	0,9000	0,9667	0,9000	0,9000	0	0,8000	0,9333	0,4333	0,5333	0,6806
He		0,0966	0,8181	0,8305	0,8497	0,6130	0,8435	0,8944	0	0,8271	0,9079	0,4441	0,4271	0,6293
F _{IS}		-0,0357	-0,1020	0,0373	-0,0603	-0,5928	-0,0682	-0,0064	N.A.	0,0333	-0,02850	0,0246	-0,2540	-0,0829
EHW		1,0000	0,3974	0,2470	0,4953	0,0000*	0,8887	0,6211	No info.	0,2159	0,5059	0,4400	0,2200	
P5	39													
Na/Ne		2/1,23	8/5,37	14/7,98	15/9	4/2,21	13/3,16	12/7,09	1/1	11/4,26	12/6,06	5/1,32	4/1,94	8,42/4,22
Np/ Na _{F>5%}		0/2	0/6	0/7	1/9	0/2	1/4	0/7	0/1	3/3	0/6	1/2	1/2	7/51
R _A		1,999	7,809	12,620	12,660	3,485	9,574	11,222	1,000	9,191	9,868	4,450	3,158	7,25
Ho		0,2051	0,7179	0,7949	0,9231	0,9231	0,7436	0,8205	0	0,8205	0,7949	0,2105	0,4474	0,6168
He		0,1865	0,8245	0,8861	0,9004	0,5551	0,6930	0,8701	0	0,7752	0,8458	0,2442	0,4902	0,6059
F _{IS}		-0,1014	0,1307	0,1042*	-0,0255	-0,6775	-0,0741	0,0577	N.A.	-0,0592	0,0610	0,13953	0,0884	-0,0211
EHW		1,0000	0,1432	0,1384	0,1160	0,0000*	0,6851	0,0044*	No info.	0,5098	0,2934	0,1189	0,0228	
P6	24													
Na/Ne		3/1,97	6/3,75	13/10,29	16/11,18	3/2,20	11/2,73	13/7,15	1/1	14/9,37	7/4,38	5/1,76	2/1,75	7,83/4,79
Np/ Na _{F>5%}		0/2	0/5	0/9	1/7	0/3	0/4	1/7	0/1	1/9	0/5	0/3	0/2	3/57
R _A		3,000	5,995	12,822	15,640	3,000	10,781	12,577	1,000	13,660	6,989	4,956	2,000	7,70
Ho		0,3636	0,8333	0,9583	0,9167	0,6250	0,6522	0,7917	0	0,9167	0,8333	0,4783	0,1250	0,6245
He		0,5032	0,7491	0,9220	0,9300	0,5576	0,6473	0,8785	0	0,9122	0,7881	0,4415	0,4388	0,6474
F _{IS}		0,2820	-0,1151	-0,0403	0,0146	-0,1238	-0,0076	0,1008	N.A.	-0,0050	-0,0587	-0,0852	0,7195*	0,0243
EHW		0,2380	0,7200	0,5884	0,3501	0,1771	0,4645	0,0646	No info,	0,0952	0,6986	0,8485	0,0006*	
P7	33													
Na/Ne		3/1,50	8/4,49	10/5,54	16/8,47	3/1,70	12/2,80	13/8,87	4/1,13	13/6,41	9/4,53	7/1,79	2/1,99	8,33/4,10
Np/ Na _{F>5%}		0/3	1/6	0/5	1/7	0/3	2/3	0/7	3/1	2/8	2/4	2/2	0/2	13/51
R _A		2,997	7,329	8,785	13,446	2,999	10,713	12,056	3,226	12,249	8,377	6,310	2,000	7,54
Ho		0,2727	0,8485	0,6970	0,9091	0,4848	0,6250	0,6250	0,1212	0,9091	0,7188	0,4375	0,5625	0,6009
He		0,3399	0,7893	0,8322	0,8956	0,4191	0,6538	0,9013	0,1179	0,8569	0,7917	0,4479	0,5060	0,6293
F _{IS}		0,2000	-0,0763	0,1646*	-0,0153	-0,1597	0,0447	0,3100*	-0,0281	-0,0619	0,0934	0,0236	-0,1138	0,0320
EHW		0,1624	0,9089	0,1893	0,1729	0,8558	0,1309	0,0000*	1,0000	0,8571	0,3937	0,1487	0,7245	

Tabela 3 – Parâmetros de diversidade genética de *Hypostomus ancistroides* coletados no rio Laranjinha, no sul do Brasil, para os marcadores de microssatélites e mitocondriais (*D-loop*). Considerando os sete trechos do rio onde as amostras das populações (P1 a P7) foram coletadas. N – número de indivíduos analisados, \bar{P} – proporção de locos polimórficos, A – número total de alelos encontrados na amostra, Np – número de alelos privados, \bar{N}_A – número médio de alelos por loco na amostra, \bar{N}_e - número médio de alelos efetivos por locos na amostra, H_O – heterozigozidade observada média na amostra, H_e – Heterozigozidade esperada média na amostra, H_s – Heterozigozidade esperada de Nei (1973), F_{IS} – Índice de endogâmia dentro da população, Nh – número de haplótipos encontrados, h – Diversidade haplotípica, π – iversidade nucleotídica, D - teste de neutralidade de Tajima (1989), F_s – teste de neutralidade de Fu (1997). *P < 0,05

Populações	N	Microssatélite										<i>D-loop</i>			
		\bar{P}	A	Np	\bar{N}_A	\bar{N}_e	H_O	H_e	H_s	F_{IS}	Nh	h	π	D	F_s
P1	31	91,7%	74	6	6,167	3,264	0,552	0,556	0,547	0,004	4	0,1871 +/- 0,0927	0,000350 +/- 0,000504	-1,731*	-3,436*
P2	30	91,7%	77	0	6,417	3,598	0,626	0,580	0,570	-0,084	3	0,1310 +/- 0,0821	0,000241 +/- 0,000411	-1,507*	-2,355*
P3	28	91,7%	93	5	7,750	4,411	0,645	0,630	0,618	-0,030	4	0,2672 +/- 0,1067	0,000507 +/- 0,000624	-1,527*	-2,610*
P4	30	91,7%	95	1	7,917	4,468	0,681	0,629	0,619	-0,083	4	0,4345 +/- 0,0952	0,003587 +/- 0,002315	-2,382*	2,441
P5	39	91,7%	101	7	8,417	4,219	0,617	0,606	0,598	-0,021	5	0,4345 +/- 0,0919	0,001035 +/- 0,000953	-1,079	-1,855
P6	24	91,7%	94	3	7,833	4,795	0,624	0,647	0,634	0,024	7	0,7355 +/- 0,0712	0,008079 +/- 0,004593	-1,504	1,805
P7	33	100%	100	13	8,333	4,103	0,601	0,629	0,620	0,032	10	0,8049 +/- 0,0538	0,010816 +/- 0,005880	-1,148	1,465
Geral	30,71		164	35	7,548	4,122	0,621	0,601		-0,023	5,29	0,5034 +/- 0,0412	0,003782 +/- 0,002344	-1,554	-0,649

A análise para possíveis ocorrências de *bottlenecks* recentes, por meio dos dados de microssatélites, mostrou-se significativa nas amostras P1, P5 e P7 apenas para o Modelo SMM, enquanto que na amostra P4 houveram indicativos de excesso de heteroziguidade apontados pelos modelo IAM e SMM (Tabela 4).

Tabela 4 – Teste de sinal para excesso de heteroziguidade para os 12 locos de microssatélites nas sete populações de *Hypostomus ancistroides* estudadas no rio Laranjinha. IAM – Modelo de Alelos Infinitos (*Infinite Allele Model*), TPM – Modelo Bifásico (90% SMM) (*Two Phase Model*), SMM – Modelo Passo a Passo (*Stepwise Mutation Model*). * $P \leq 0,05$ indicando excesso de heteroziguidade.

População	IAM	TPM	SMM
P1	0,51953	0,20605	0,00928*
P2	0,10156	0,46484	0,20605
P3	0,05371	0,70020	0,10156
P4	0,00684*	0,70020	0,02100*
P5	0,46484	0,24023	0,00488*
P6	0,10156	0,57715	0,89844
P7	0,67725	0,12939	0,01050*

D-loop

A região *D-loop* foi parcialmente amplificada, gerando um fragmento de aproximadamente 600 pb, posteriormente, foram sequenciados 557 pb, a análise no programa tRNAscan-SE não apontou a existência de RNAt. Entretanto, por meio da análise do BLAST (NCBI), foi verificado que a porção da região *D-loop* sequenciada localiza-se ao lado do tRNA-Pro. Do total de bases, 40 foram polimórficas, este polimorfismo foi gerado por 33 substituições, sendo 25 transições e oito transversões, e mais sete mutações “*indels*”. A composição nucleotídica encontrada nesta região foi de 22,06% de C, 30,15% de T, 36,35% de A e 11,45% de G (Tabela 5).

Os 40 sítios polimórficos, considerando todas as amostras, produziram 17 haplótipos que apresentam uma diversidade haplotípica (h) de 0,5034 (+/- 0,0412) e uma diversidade nucleotídica (π) de 0,003782 (+/- 0,002344). O número médio de haplótipos por amostra foi de 5,29 haplótipos. A amostra P2 apresentou os menores índices de diversidade ($N_h = 3$, $h = 0,1310$ +/- 0,0821, $\pi = 0,000241$ +/- 0,000411),

enquanto que a amostra P7, apresentou os maiores índices ($N_h = 10$; $h = 0,8049 \pm 0,0538$; $\pi = 0,010816 \pm 0,005880$), (Tabela 3; Figura 3).

O haplótipo 02 foi o mais frequente (69,77%), distribuído em todos os trechos amostrais e possui haplótipos derivados em formato de estrela o que nos indica que este seria o haplótipo ancestral da área estudada (FREELAND, 2005). Algumas amostras apresentaram haplótipos privados, são estas: amostra P3 (Hap 06 e 07), amostra P5 (Hap 10), amostra P6 (Hap 12) e amostra P7 (Hap 14, 15, 16 e 17) (Tabela 5; Figuras 3 e 5).

Tabela 5 - Sítios variáveis entre haplótipos da região *D-loop* encontrados entre 215 amostras de *Hypostomus ancistroides* provenientes de sete localidades do rio Laranjinha, o qual pertence à bacia do Alto rio Paraná, Brasil.

Haplótipo	Nucleotídeo dos sítios variáveis	Frequência absoluta por amostra							Total do haplótipo	Número de acesso GenBank
		1	2	3	4	5	6	7		
Hap 01	AATGCCTATTCGTCTAAGAAGCATAGAATC--CCT--TTA	1	0	0	0	0	11	3	15	KJ126727
Hap 02	AATGCCTATTCGTCTAAGAATCATAGAATC--CCT--TTA	28	28	24	22	29	6	13	150	KJ126728
Hap 03	AATGCCTACTCGTCTAAGAATCATAGAATC--CCT--TTA	1	0	0	1	0	0	0	2	KJ126729
Hap 04	AGTGCCTATTCGTCTAAGAATCATAGAATC--CCT--TTA	1	1	0	6	3	0	0	11	KJ126730
Hap 05	AATGCCTATCCGTCTAAGAATCATAGAATC--CCT--TTA	0	1	2	0	5	1	0	9	KJ126731
Hap 06	AACGCCTATTCGTCTAAGAATCATAGAATC--CCT--TTA	0	0	1	0	0	0	0	1	KJ126732
Hap 07	AATACCTATTCGTCTAAGAATCATAGAATC--CCT--TTA	0	0	1	0	0	0	0	1	KJ126733
Hap 08	AATAATCATTAGATTAGAA-GATCGGAGCACAC-TTTCTA	0	0	0	1	0	0	1	2	KJ126734
Hap 09	AATGCCTATTCGTCTAAGAAGCATAGAATC--CC---TTA	0	0	0	0	1	3	4	8	KJ126735
Hap 10	AGTGCCTGTTTCGTCTAAGAATCATAGAATC--CCT--TTA	0	0	0	0	1	0	0	1	KJ126736
Hap 11	AATAATCATTAGATTAGAA-GATCGGAGCACAT-TTTCTA	0	0	0	0	0	1	1	2	KJ126737
Hap 12	AATAATCATTAGATTAGGA-GATCGGAGCACAC-TTTCTA	0	0	0	0	0	1	0	1	KJ126738
Hap 13	AATGCCTATTCGTCTAAGGAGCATAGAATC--CCT--TTA	0	0	0	0	0	1	6	7	KJ126739
Hap 14	AATGCCTATTCGTCTAAGAAGCATAAAATC--CC---TTA	0	0	0	0	0	0	2	2	KJ126740
Hap 15	GATAGTCATTAATCTAGAAGCATAGAATC--CC---TCA	0	0	0	0	0	0	1	1	KJ126741
Hap 16	AATAATCATTTCGATTAGAA-GATCGGAGCACAT-TTTCTA	0	0	0	0	0	0	1	1	KJ126742
Hap 17	AATGCCTATTCGTCTAAGAAGCATAGGATC--CCT--TTG	0	0	0	0	0	0	1	1	KJ126743

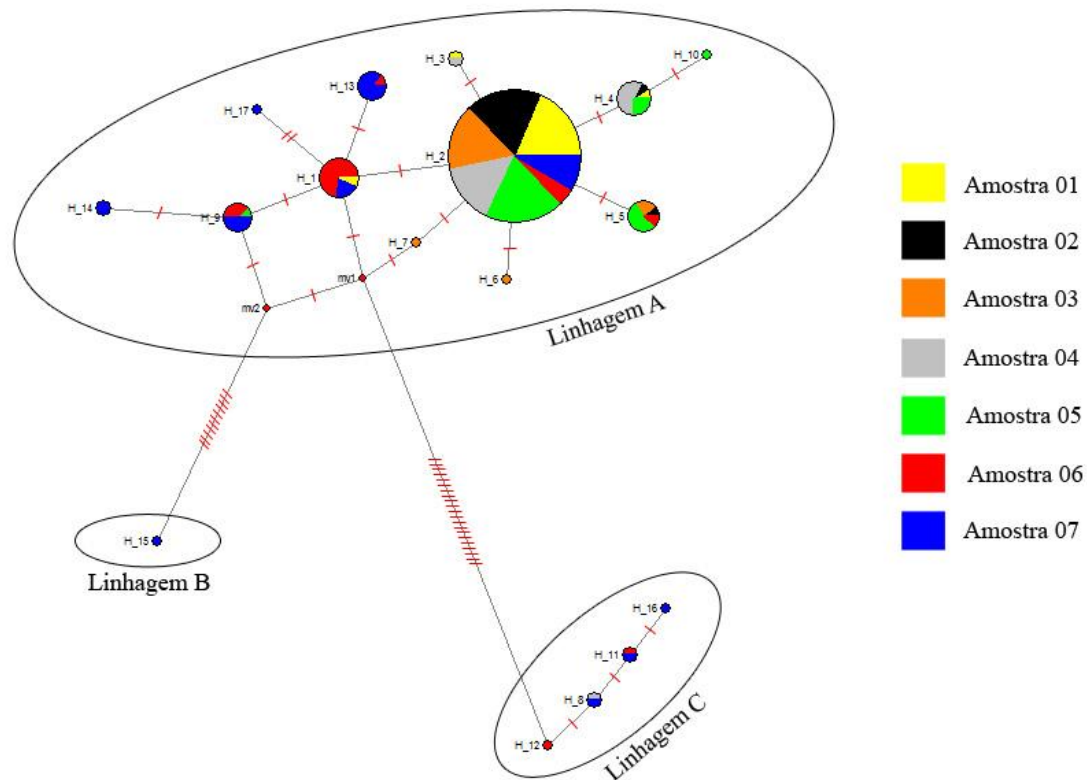


Figura 3 – Rede de haplótipos encontrados para sete amostras (1 a 7) de populações de *Hypostomus ancistroides*, coletados ao longo do rio Laranjinha (bacia do Alto rio Paraná, sul do Brasil), gerada por meio do programa Network 4.6.1.1. As análises foram feitas com base no algoritmo *median-joining*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Cores de preenchimento representam as amostras e as barras vermelhas representam as mutações entre os haplótipos

Os testes de neutralidade seletiva de Tajima (D) e Fu (Fs) foram negativos e significativos para as amostras P1, P2 e P3; a amostra P4 apresentou apenas o D negativo e significativo, as demais amostras não apresentaram valores significativos (Tabela 3). Por outro lado, o teste de D de Tajima, não apresentou valores diferentes de zero para as amostras P5, P6 e P7, enquanto que o teste Fs de Fu não apresentou valores significativos para as amostras P4, P5, P6 e P7. Na análise considerando todas as amostras não foram detectados valores significativamente diferentes de zero para nenhum destes dois testes. Desta forma não podemos rejeitar a hipótese de neutralidade seletiva do marcador mitocondrial *D-loop*.

O modelo de evolução nucleotídica mais provável apontado pelo programa MEGA 5.2 foi Tamura 3 Parâmetros.

A rede de haplótipos e as análises filogenéticas (Figuras 3, 4 e 5) revela a existência de três linhagens mitocondriais diferentes, a primeira (linhagem A) contém 12 dos 17 haplótipos e 208 dos 215 indivíduos, a segunda linhagem (linhagem B) é representada por apenas um haplótipo presente em um único indivíduo enquanto a última linhagem (linhagem C) é representada por quatro haplótipos e seis indivíduos. As três análises *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima Verossimilhança (MV) e Máxima Parcimônia (MP) recuperaram a mesma topologia para os 17 haplótipos sempre com valores consistentes de *bootstrapping* para os nós que evidenciam a formação das linhagens (Figuras 4 e 5). Ainda a rede de haplótipos (Figura 3) mostra a grande quantidade de passos mutacionais que separam as 3 linhagens haplotípicas.

As amostras P4 e P6 possuem duas linhagens haplotípicas em simpatria, enquanto que a amostra 07 é a única que possui as três linhagens mitocondriais em simpatria (Figuras 3 e 5).

A distâncias genéticas entre as linhagens AxB, AxC e BxC foram, respectivamente, $2,4\% \pm 0,7$, $3,4\% \pm 0,8$ e $3,1\% \pm 0,7$. No caso das linhagens A e C, as quais mostraram a ocorrência de mais de um haplótipo, a distância genética média dentro de cada uma destas linhagens foi de: $0,111\% \pm 0,0536$ (A) e $0,2289\% \pm 0,1314$ (C).

Comparando-se os dados de microsatélite dos grupos de indivíduos pertencentes à cada uma das três linhagens mitocondriais, há indicativo de troca de material genético nuclear entre os indivíduos das diferentes linhagens em simpatria no rio Laranjinha. As linhagens B e C possuem um total de 64 alelos de microsatélite para os 12 locos analisados, destes, apenas dois alelos (alelo 232 do loco Hanc 02 e alelo 242 do loco Hanc 184) são exclusivos destas linhagens, o que indica a existência de recombinação gênica nuclear apesar da distância entre as linhagens, sugerindo a existência de reprodução envolvendo indivíduos destas duas linhagens.

Todos os indivíduos que possuíam os haplótipos das linhagens B e C, e uma amostra dos indivíduos da linhagem A foram enviados à um especialista no gênero *Hypostomus*, para análise de características morfológicas e todos foram identificados como pertencentes à espécie *Hypostomus ancistroides* (C. H. ZAWADZKI, comunicação pessoal).

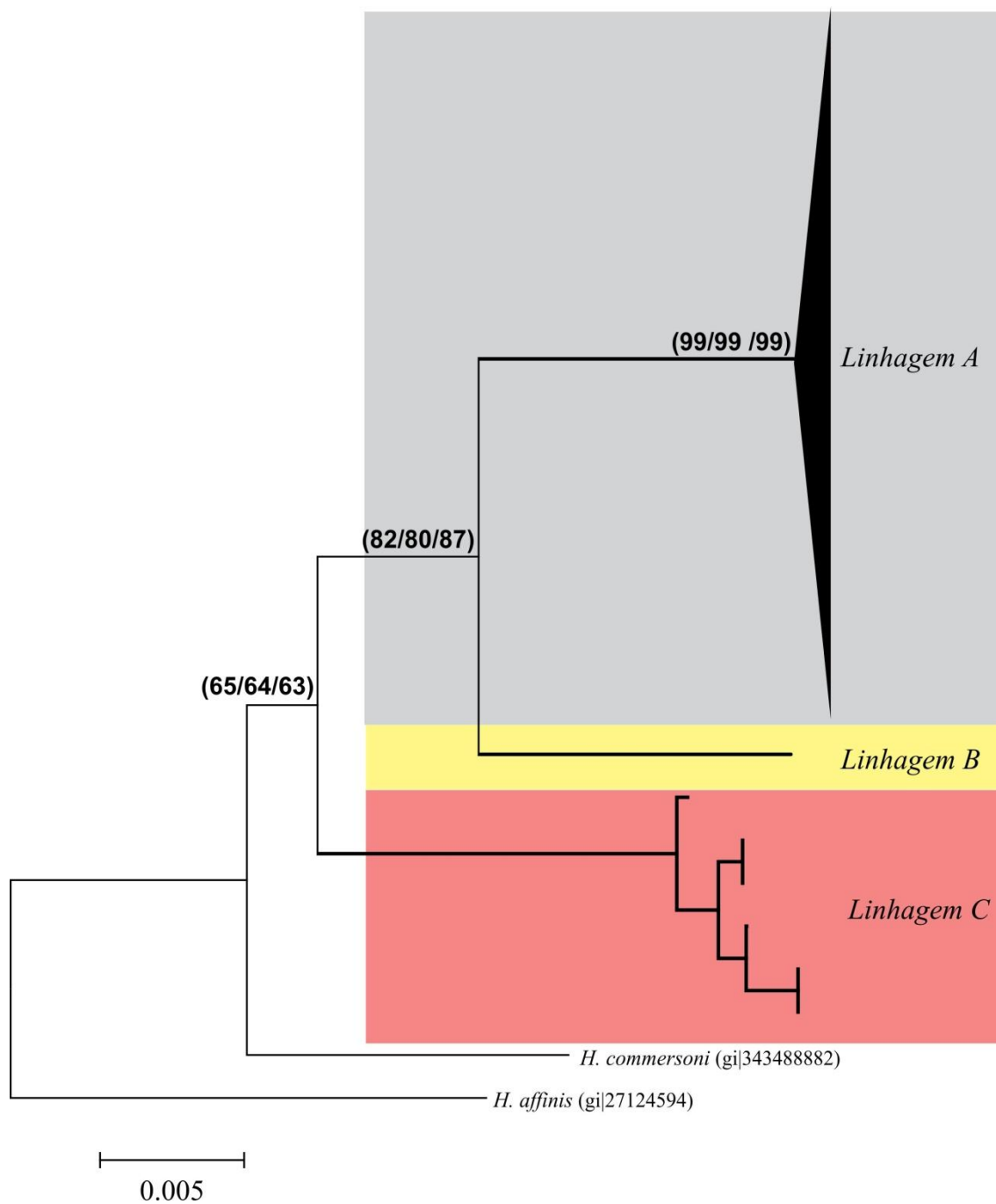


Figura 4 - Árvore de NJ com todos os 215 indivíduos + dois indivíduos “outgroup”. Números entre parênteses representam valores de *bootstrap* para análises de NJ/ MV / MP)

Tabela 6 – AMOVA (Análise da Variância Molecular) para as amostras de *Hypostomus ancistroides* coletados ao longo do rio Laranjinha, para os marcadores microsstélites e *D-loop*. * $P \leq 0,01$ (teste de significância com 1023 permutações).

Fonte de Variação	Porcentagem de variação		
	Microsatélite		<i>D-loop</i>
	F_{ST}	R_{ST}	Φ_{ST}
Entre populações	7,81%	7,20%	11,75%
Dentro de populações	92,19%	92,80%	88,25%
Índice de fixação	0,08*	0,07*	0,12*

Para os marcadores microsstélites, as comparações par a par do índice de fixação F_{ST} revelaram valores significativos para todas as comparações, o maior valor foi encontrado entre as amostras P1 e P7 (F_{ST} : 0,16825), enquanto o menor valor foi entre as amostras P3 e P4 (F_{ST} : 0,00591). O segundo estimador empregado (R_{ST}), revelou uma diferenciação significativa entre a maioria dos pares de amostras analisadas (exceto apenas entre quatro pares de amostras (Tabela 7)); neste caso, contudo, o maior valor observado foi entre as amostras P2 e P7 (R_{ST} : 0,16394) e o menor entre as amostras P2 e P4 (R_{ST} : 0,02371). No caso das estimativas de distância genética de Nei, o maior valor encontrado foi entre as amostras P3 e P7 (D_{Nei} : 0,0102) e o menor valor entre as amostras P3 e P4 (D_{Nei} : 0,0102) (Tabela 7).

Tabela 7 – Diferenciação genética entre os pares de populações (P1 a P7) de *Hypostomus ancistroides* do rio Laranjinha estimada a partir dos marcadores microssatélites e *D-loop*. Φ_{ST} , F_{ST} e R_{ST} – parâmetros que usam como base as estatísticas F de Wright. D_{Nei} - distância genética de Nei (1978). Também são indicadas as distâncias geográficas entre os locais onde as sete amostras foram coletadas. * $P < 0,05$ (teste de significância com 1023 permutações)

Pares de Amostras	Distância (km)	Microssatélite			<i>D-loop</i>
		F_{ST}	R_{ST}	D_{Nei}	Φ_{ST}
P1xP2	70,5	0,0324*	-0,0038	0,0444	-0,0135
P1xP3	134,0	0,0672*	0,0673*	0,1056	0,0118
P1xP4	175,7	0,0607*	0,0440*	0,0941	0,0166
P1xP5	250,9	0,0608*	0,0845*	0,0923	0,0289
P1xP6	289,2	0,1253*	0,1362*	0,2339	0,2130*
P1xP7	348,9	0,1682*	0,1421*	0,3395	0,1463*
P2xP3	63,4	0,0304*	0,0498*	0,0467	-0,0096
P2xP4	105,1	0,0332*	0,0237*	0,0517	0,0195
P2xP5	180,3	0,0362*	0,0813*	0,0555	0,0116
P2xP6	218,6	0,1088*	0,1447*	0,2102	0,2249*
P2xP7	278,3	0,1516*	0,1639*	0,3126	0,1535*
P3xP4	41,7	0,0059*	-0,0064	0,0102	0,0272*
P3xP5	116,9	0,0195*	0,0149	0,0324	0,0097
P3xP6	155,2	0,0991*	0,0906*	0,2191	0,2090*
P3xP7	214,9	0,1473*	0,1288*	0,3431	0,1441*
P4xP5	75,2	0,0157*	0,0117	0,0259	0,0156
P4xP6	113,5	0,0862*	0,0678*	0,1860	0,1281*
P4xP7	173,2	0,1417*	0,0980*	0,3268	0,0949*
P5xP6	38,3	0,0660*	0,0586*	0,1251	0,2213*
P5xP7	98,0	0,1154*	0,0810*	0,2328	0,1606*
P6xP7	59,7	0,0245*	0,0014	0,0431	-0,0252

Diferentemente, dos valores de F_{ST} , obtidos a partir dos marcadores nucleares, que se mostraram significativamente diferente de zero em todos os pares de populações analisadas, os valores de Φ_{ST} (análogo ao F_{ST}), obtidos a partir dos marcadores mitocondriais (*D-loop*), revelaram valores significativos em todos comparativos envolvendo as populações P6 e P7 e também entre o par P3-P4, contudo não para os demais pares analisados (Tabela 7). O maior valor encontrado foi entre o par P2-P6 (Φ_{ST} : 0,22490) e o menor valor entre as amostras P3-P4 (Φ_{ST} : 0,02717), sendo este o único par de amostras no qual o valor significativo de Φ_{ST} não envolveu as populações P6 ou P7 (Tabela 7).

A correlação entre a distância geográfica e a divergência genética (F_{ST} , R_{ST} e Φ_{ST}), estimada para os diferentes pares de amostras por meio do teste de Mantel, foi significativa apenas para os estimadores de divergência genética F_{ST} ($r = 0,7474$ e $P = 0,005$) e R_{ST} ($r = 0,8394$ e $P = 0,003$), ou seja, os obtidos por meio dos marcadores microssatélites (Figura 6).

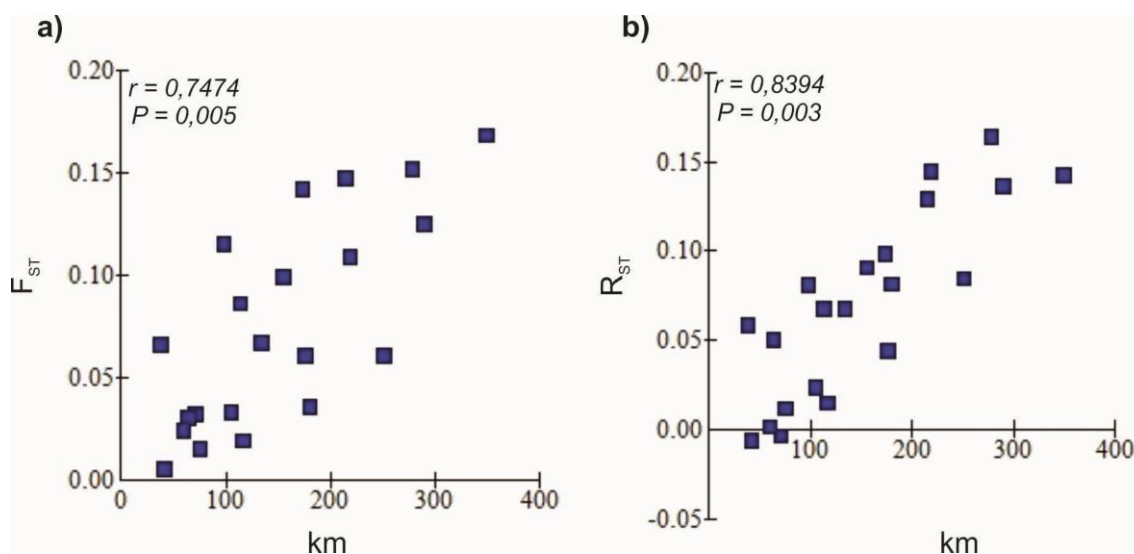


Figura 6 - Teste de Mantel, correlações entre a divergência genética e a distância geográfica entre os diferentes pares de amostras de populações (P1 a P7) de *Hypostomus ancistroides* coletados em sete pontos no rio Laranjinha, com base nos marcadores de microssatélites. a) utilizando o estimador de divergência genética F_{ST} , b) utilizando o estimador de divergência genética R_{ST} .

Para os marcadores microssatélites, a análise de agrupamentos bayesianos, apontou um K (número de agrupamentos) mais provável igual a dois. O gráfico

construído à partir do $K = 2$, mostra nitidamente a formação de dois grandes grupos, um contendo as amostras P1, P2, P3, P4 e P5 e outro com as amostras P6 e P7 (Figura 7).

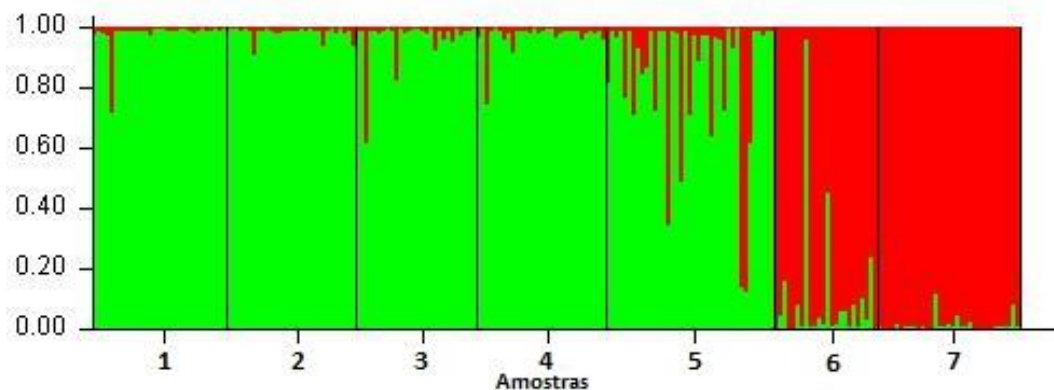


Figura 7 – Representação gráfica dos agrupamentos bayesianos ($K=2$), gerados a partir de 12 locos de microssatélites para as sete amostras de *Hypostomus ancistroides* coletadas em sete localidades ao longo do rio Laranjinha., bacia do Alto rio Paraná.

A estimativa de fluxo gênico recente realizada por meio de análise bayesiana, apontou que a amostra P3 possui uma alta taxa de migrantes genéticos por geração em direção à: P2 (26,9%), P4 (30%) e P5 (30,7%), e em menor porcentagem com as amostras P1 (4,6%) e P6 (2,4%). Já a amostra P7 apresenta migração durante as últimas gerações apenas em direção à P6 em a uma taxa de 27,5%. (Tabela 8).

Tabela 8 – Inferência de fluxo gênico obtida por análise bayesiana utilizando o programa BeysAss. Porcentagem de migrantes e de não migrantes dentro de cada uma das sete amostras estudadas (P1 a P7). Entre parênteses intervalo de confiança (IC).

Proporção de indivíduos não migrantes (95% IC) por trecho amostral						
1	2	3	4	5	6	7
0,933 (0,874 - 0,975)	0,676 (0,667 - 0,699)	0,988 (0,960 - 1,000)	0,677 (0,667 - 0,707)	0,675 (0,667 - 0,694)	0,680 (0,667 - 0,712)	0,990 (0,965 - 1,000)
Proporção de indivíduos migrantes (95% IC) Por trecho amostral						
1	2	3	4	5	6	7
P 2 0,004 (5,058x10 ⁻⁰⁷ - 0,022)	P 1 0,037 (4,248x10 ⁻⁴ - 0,109)	P 1 0,002 (3,678x10 ⁻¹⁰ - 0,016)	P 1 0,005 (2,116x10 ⁻⁰⁶ - 0,024)	P 1 0,004 (1,336x10 ⁻⁰⁶ - 0,019)	P 1 0,005 (2,478x10 ⁻⁰⁶ - 0,028)	P 1 0,002 (6,639x10 ⁻¹⁰ - 0,0130)
P 3 0,046 (0,011 - 0,100)	P 3 0,269 (0,192 - 0,320)	P 2 0,002 (1,335x10 ⁻⁰⁹ - 0,013)	P 2 0,004 (2,374x10 ⁻⁰⁶ - 0,024)	P 2 0,004 (1,839x10 ⁻⁰⁶ - 0,019)	P 2 0,005 (1,532x10 ⁻⁰⁶ - 0,029)	P 2 0,002 (5,842x10 ⁻¹⁰ - 0,012)
P 4 0,004 (1,237x10 ⁻⁰⁶ - 0,020)	P 4 0,004 (1,723x10 ⁻⁰⁶ - 0,023)	P 4 0,002 (2,780x10 ⁻¹⁰ - 0,014)	P 3 0,300 (0,259 - 0,328)	P 3 0,307 (0,272 - 0,329)	P 3 0,024 (1,842x10 ⁻⁴ - 0,085)	P 3 0,002 (9,717x10 ⁻¹⁰ - 0,012)
P 5 0,004 (5,461x10 ⁻⁰⁷ - 0,024)	P 5 0,004 (3,018x10 ⁻⁰⁶ - 0,021)	P 5 0,002 (5,572x10 ⁻¹⁰ - 0,013)	P 5 0,004 (1,468x10 ⁻⁰⁶ - 0,025)	P 4 0,003 (7,242x10 ⁻⁰⁷ - 0,020)	P 4 0,005 (1,161x10 ⁻⁰⁶ - 0,030)	P 4 0,001 (1,506x10 ⁻⁰⁹ - 0,011)
P 6 0,004 (1,245x10 ⁻⁰⁶ - 0,019)	P 6 0,005 (4,622x10 ⁻⁰⁶ - 0,025)	P 6 0,002 (5,469x10 ⁻¹⁰ - 0,014)	P 6 0,004 (1,592x10 ⁻⁰⁶ - 0,025)	P 6 0,003 (1,014x10 ⁻⁰⁶ - 0,018)	P 5 0,005 (2,335x10 ⁻⁰⁶ - 0,028)	P 5 0,002 (7,563x10 ⁻¹⁰ - 0,012)
P 7 0,005 (1,203x10 ⁻⁰⁶ - 0,027)	P 7 0,004 (1,63x10 ⁻⁰⁶ - 0,025)	P 7 0,002 (4,882x10 ⁻¹⁰ - 0,016)	P 7 0,005 (1,765x10 ⁻⁰⁶ - 0,026)	P 7 0,004 (1,584x10 ⁻⁰⁶ - 0,023)	P 7 0,275 (0,209 - 0,321)	P 6 0,002 (4,134x10 ⁻¹⁰ - 0,012)

O dendrograma de similaridade gerado pelo método UPGMA, baseado na distância genética de Nei (1978), para os marcadores de microsatélite deixou evidente a divisão do rio em dois grandes agrupamentos, um contendo as amostras P6 e P7, outro contendo as amostras P1, P2, P3, P4 e P5. Este último agrupamento ainda possui uma divisão entre as amostras localizadas mais próximas à nascente (01 e 02) e àquelas da região média do rio (03, 04 e 05). Os valores de réplicas similares no teste estatístico de *bootstrapping*, mostram grande consistência dos agrupamentos.

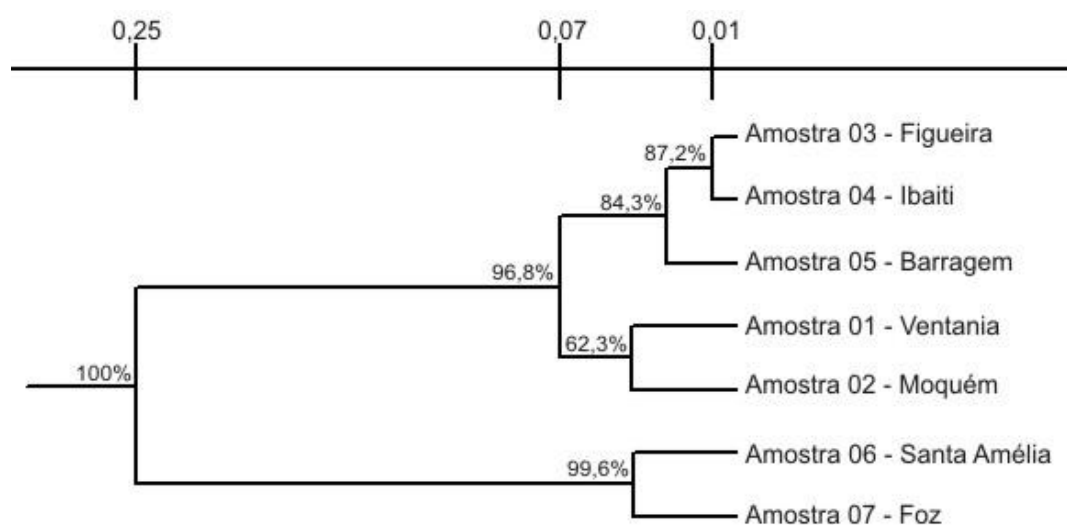


Figura 8 – Dendrograma de similaridade, método de UPGMA, baseado na distância genética de Nei (1978) – representada na barra superior, mostrando os agrupamentos entre as sete amostras populações de *Hypostomus ancistroides* coletadas em sete diferentes pontos do rio Laranjinha (informações complementares sobre os pontos de coleta indicados ao lado de cada amostra na figura são apresentadas na Tabela 1 e Figura 2). Valores dos nós representam a porcentagem de réplicas similares para *bootstrapping* com 1.000 permutações.

4 DISCUSSÃO

4.1 Diversidade Genética

Até o momento não haviam disponíveis marcadores do tipo microsatélite para *H. ancistroides* o que impossibilita a comparação em nível específico com outros trabalhos existentes na literatura. De qualquer forma, embora de forma cautelosa, é possível fazer uma comparação dos resultados de diversidade genética do presente estudo com os resultados obtidos a partir de análises com outros marcadores

moleculares (isoenzimas e RAPD) encontrados por outros autores para esta espécie de cascudo (ZAWADZKI et al., 2005; SOFIA et al., 2008). De forma distinta ao encontrado por estes autores, a diversidade genética encontrada no presente estudo, de um modo geral, foi alta, uma vez que em todas as populações o H_e ficou acima de 0,55; principalmente por se tratar de uma espécie não migradora e com cuidado parental (AGOSTINHO et al., 2007; ORSI, 2010), onde geralmente encontram-se menores índices de diversidade genética (LANGEN et al. 2011). As heterozigosidades observada e esperada médias foram superiores a 0,6 o que está acima da média encontrada para espécies de água doce para marcadores de microsatélite ($0,54 \pm 0,25$) (DEWOODY e AVISE, 2000).

Telles et al. (2010) analisando, por meio de microsatélites uma única amostra de outra espécie do mesmo gênero (*H. gmnorhynchus*), detectou baixos níveis de diversidade genética para a espécie estudada. Ainda que considerando apenas os locos polimórficos, a heterozigosidade esperada média de 0,3965 e um número médio 3,8 alelos por loco, a amostra P1 do presente trabalho, a qual apresentou os menores índices de diversidade neste estudo, comparativamente apresentou índices de diversidade muito superiores aos relatados por Telles et al. (2010) para *H. gmnorhynchus*. Fazendo uso de marcadores isoenzimáticos, Zawadzki et al. (2005) encontraram para diferentes espécies de *Hypostomus*, incluindo *H. ancistroides*, valores baixos de diversidade genética e atribuíram como uma das possíveis causas para este fato o efeito da endogamia resultante, em parte, do comportamento sedentário de *Hypostomus*.

Em outro estudo, utilizando marcadores RAPD em *Hypostomus ancistroides*, Sofia et al. (2006) encontraram um H_e variando de 0,1022 a 0,1526, apontando também uma diversidade relativamente baixa. Entretanto, os marcadores microsatélites que estão certamente entre os mais polimórficos (WARD, 2002; FRANKHAM, BALOU e BRISCOE, 2010) e quando comparados a marcadores dialélicos dominantes como os RAPDs geralmente apresentam maiores níveis de diversidade como, por exemplo, no trabalho realizado por Allendorf e Seeb (2000) em que os autores encontram maiores níveis de diversidade genética e obviamente maior número de alelos para os marcadores SSR. Maiores índices de diversidade em marcadores Microsatélites em relação a RAPD também foram encontrados por Paula (2006) e Ashikaga (2008). Devido ao modo como alguns índices de diversidade são obtidos, os marcadores multilocus podem

alcançar maiores valores de índices de diversidade do que marcadores dialélicos como os RAPDs.

Os bons níveis de diversidade genética encontrados no presente trabalho para *H. ancistroides* são coerentes e justificam sua grande plasticidade fenotípica, expressa tanto por meio de variações morfológicas (WEBER, 2003) quanto pela ocupação de habitats diversos, já que existem registros da espécie em ribeirões, na calha principal dos rios ou em reservatórios; ocorrendo desde ambientes de cabeceira, até na foz dos grandes rios próximo à grandes reservatórios. Também é possível encontrar *H. ancistroides* desde ambientes altamente preservados até aqueles com grandes perturbações antrópicas como ribeirões urbanos (CASATTI, 2003; CASTRO et al., 2003; CASATTI, 2004; CASTRO et al., 2004; CASATTI, 2005; BRITTO e CARVALHO, 2006; GRAÇA e PAVANELLI, 2007; SHIBATTA, GEALH e BENNEMANN, 2007; VIEIRA e SHIBATTA, 2007; SOFIA et al., 2008; CUNICO et al., 2009; COSTA et. al, 2013)

Pereira, Foresti e Oliveira (2009) elencam como fatores que podem induzir desvios do EHW em análises por microssatélites: o alto número de alelos por locus, ocorrência de erros de genotipagem por alelos nulos, ocorrência de bandas espelho, e alelos “drop-out”, efeito de Wahlund, seleção de alelos específicos e endocruzamento. Neste contexto, as amostras P6 e P7, apresentaram deficiência no número de heterozigotos, o que gerou um coeficiente de endogamia (F_{IS}) significativo, certamente provocando desvios do EHW, a deficiência no número de heterozigotos, neste caso pode ser atribuídas a provável presença de alelos nulos conforme análise realizada pelo programa Micro-Checker.

Em outras locos (Hanc 09: P1, P2, P3, P4 e P5 e Hanc 32: P1 e P5) presentes em diferentes amostras onde não há evidências de alelos nulos e também não há um coeficiente de endogamia significativo, uma possível explicação para ausência de EHW é a existência de fluxo gênico apontado pela inferência bayesiana. O fluxo gênico fere uma das premissas do EHW, que prevê que não pode haver troca gênica (TEMPLETON, 2011), e pode ter acarretado os desvios significativos destes locos nestas populações.

Apesar de que nenhuma população apresentou valores significativos para o coeficiente de endogamia (F_{IS}) geral, poucos locos (cinco das 84 possíveis combinações: número de loco x número de amostras) em algumas amostras apontaram alguma deficiência significativa de heterozigotos (Tabela 2). Conforme já foi dito, há evidências de alelos nulos para os locos Hanc 194 (amostra P6) e Hanc 32 (amostra P7), o que poderia explicar tal deficiência, entretanto os demais loci nas outras populações, podem refletir em parte os hábitos sedentários e o cuidado parental inerente à espécie (AGOSTINHO et al., 2007; ORSI, 2010). É comum em algumas espécies não migradoras encontrarmos algum nível de endogamia. Sofia et al. (2008) atribuíram os baixos níveis de diversidade encontrados em *H. ancistroides* aos seus hábitos sedentários e possível endogamia.

Nas duas amostras que apresentaram locos em desequilíbrio de ligação nenhum padrão foi observado entre os locos que estavam em desequilíbrio. Do total de 396 testes para desequilíbrio de ligação realizados, apenas 1,26% mantiveram-se significativos após a correção sequencial de Bonferroni, portanto, é improvável que o desequilíbrio de ligação encontrado para as amostras seja, de fato, gerado por uma “ligação física” dos locos em questão, situações semelhantes foram encontradas por Adamson, Hurwood e Mather (2012). Segundo Templeton (2011), vários fatores podem criar um desequilíbrio de ligação, tais como, a mutação, acasalamento preferencial, o tamanho populacional finito, o fluxo gênico e a seleção natural.

A diversidade haplotípica (h) é considerada o equivalente de H_e para dados de sequências haploides (FREELAND, 2005), no presente trabalho os níveis de diversidade genética da região *D-loop* foram de uma maneira geral menores do que os índices obtidos para os marcadores microssatélites. Os trechos os rios onde foram obtidas as amostras P1 a P5 apresentaram menor diversidade haplotípica (h) do que H_e , enquanto os trechos 6 e 7 apresentaram maiores diversidades haplotípicas do que H_e .

Algumas particularidades do genoma mitocondrial precisam ser levadas em conta no momento em que é comparado ao genoma nuclear, uma das questões é a natureza haploide do genoma mitocondrial, que associada à transferência vertical uniparental confere um tamanho populacional de um quarto do DNA diploide nuclear, e isto o torna muito mais sensível à eventos demográficos como “*bottleneck*” (WARD,

2002; FREELAND, 2005; MCCUSKER e BENTZEN, 2010). Desta forma, é possível que os diferentes marcadores “sofram” consequências em níveis de magnitude diferentes, como no caso do DNA mitocondrial, que pode ter sofrido mais drasticamente a perda de haplótipos e por consequência de diversidade haplotípica.

Entretanto, amostras que possuem uma grande quantidade de indivíduos com haplótipos exclusivos podem frequentemente apresentar valores de diversidade nucleotídica próximos de 1 se uma grande quantidade de indivíduos possuem haplótipos exclusivos (FREELAND, 2005; MCCUSKER e BENTZEN, 2010). Por exemplo, se duas sequências apresentam um único nucleotídeo diferente são consideradas dois haplótipos, o mesmo vale se duas sequências apresentam 10 nucleotídeos diferentes, também serão consideradas dois haplótipos, desta maneira, se duas sequências diferem em um, 10 ou 20 nucleotídeos a diversidade haplotípica não consegue detectar este tipo de situação, entretanto, a diversidade nucleotídica, leva em consideração tanto frequência de haplótipos diferentes, quanto a divergência entre eles (FREELAND, 2005).

A região *D-loop* é uma das mais adequadas para estudos populacionais, possui sequências altamente polimórficas, de duas a cinco vezes mais rápida do que a observada para sequências codificantes (MANCERA-RODRÍGUEZ, MARQUEZ, e HURTADO-ALARCÓN, 2013), sua taxa de mutação é em torno de $2,0 \times 10^{-8}$ por base, por ano (SANTOS, RUFFINO e FARIAS, 2007). Muito superior a regiões codificantes como NDH ($0,52 \times 10^{-8}$), COI ($0,27 \times 10^{-8}$) (TURNER et al., 2004) e ATP sintase 6/8 (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001). Portanto, estas diferenças relativas à velocidade de evolução devem ser levadas em conta quando se analisam dados de diversidade, estruturação e diferenciação obtidos à partir de diferentes regiões ou sequências, ainda que oriundas do mesmo genoma, neste caso o mitocondrial.

Até o presente não existia nenhum trabalho na literatura que utilizasse a região *D-loop* para estudos populacionais em *H. ancistroides*, apesar desta região do genoma mitocondrial ser uma das preferidas para estudos populacionais em peixes (MARTINS et al., 2003; BIGNOTTO et al., 2009; IERVOLINO et al., 2010; WANG et al., 2010). A análise da região *D-loop*, de outras duas espécies pertencentes à mesma ordem do que *H. ancistroides*, revelaram nove haplótipos, $h = 0,814$ e $\pi = 0,007$ em *Pseudoplatystoma*

corruscans e, sete haplótipos, $h = 0,952$ e $\pi = 0,007$ em *Pseudoplatystoma reticulatum* (BIGNOTTO et al., 2009). Neste caso, mesmo tratando-se de duas espécies migradoras, para as quais espera-se, em geral maiores índices de diversidade (SANTOS, RUFFINO e FARIAS, 2007), os dados do DNA mitocondrial de *H. ancistroides* não foram muito discrepantes, pois amostras como P6 e P7 mantiveram-se próximas aos valores de *P. reticulatum* e *P. corruscans*.

Utilizando outra sequência do DNA mitocondrial (ATP sintase sub-unidades 6 e 8) em *H. ancistroides*, Holanda Carvalho (2011), estudando diversas localidades na bacia do Alto rio Paraná e rio Ribeira de Iguape, encontrou uma variação no número de haplótipos por localidade de 1 a 13, diversidade haplotípica de zero a 0,972 e na diversidade nucleotídica de zero a 0,014. Apesar de que o gene da ATP sintase sub-unidades 6 e 8 sabidamente evoluírem mais lentamente do que a região *D-loop* (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001; BONI et al., 2011), verificamos que os valores não são discrepantes e encontram-se dentro de uma mesma faixa.

Mesmo as amostras que apresentaram os menores índices de diversidade do rio Laranjinha são detentoras de uma importante parcela da diversidade genética, por exemplo, a amostra P1 possui seis alelos privados de microssatélite, já a amostra P3 possui dois haplótipos mitocondriais privados. O interessante é que, de um modo geral, tanto para os marcadores SSR quanto para o *D-loop*, os maiores valores de diversidade foram encontrados próximos à foz (amostras P6 e P7) e os menores próximos à nascente (amostras P1 e P2).

Utilizando parâmetros de comparação entre as diversidades haplotípicas e nucleotídicas estabelecidos por Grant e Bowen (1998) em espécies marinhas, mas já empregados em espécies de água doce por Bignotto et al. (2009) e Holanda Carvalho (2011), podemos verificar que as amostras P6 e P7 exibem grandes valores de h e π (Tabela 9), e a grande divergência entre os haplótipos, pode ser atribuída ao contato secundário entre linhagens que se diferenciaram, ou ainda populações grandes e estáveis com longa história evolutiva.

Tabela 9 - Relação das diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) com eventos demográficos históricos. Extraída de Grant e Bowen (1998).

		Diversidade haplotípica (h)	
		Baixa ($h < 0,5$)	Alta ($h > 0,5$)
Diversidade nucleotídica (π)	Baixa ($\pi < 0,5\%$)	<i>Bottleneck</i> recente ou efeito fundador por uma única, ou poucas linhagens de DNA mitocondrial	<i>Bottleneck</i> seguido de um rápido crescimento populacional e acúmulo de mutações
	Alta ($\pi > 0,5\%$)	Divergência entre populações geograficamente subdivididas	Contato secundário entre diferentes linhagens, ou, representa uma população grande e estável com longa história evolutiva

Hollanda Carvalho (2011), recuperou uma história em que *H. ancistroides* passou por sucessivos ciclos de isolamento geográfico, diferenciação e expansão populacional (colonização), por este motivo encontrou em algumas localidades contato entre linhagens que se diferenciaram em diferentes locais. Este padrão é revelado pela alta diversidade haplotípica associada ao grande número de passos mutacionais entre alguns haplótipos, que sugerem um tempo de diversificação entre as sub-populações relativamente avançado para a espécie. Um padrão onde haplótipos separados por um grande número de passos mutacionais, de 15 a 34, são encontrados na mesma localidade, segundo o autor isto poderia ser explicado de duas maneiras, a primeira com o desaparecimento de haplótipos intermediários por amostragem de linhagem (*lineage sorting*); entretanto, se isto fosse verdadeiro, devido à estocasticidade da deriva genética, alguns haplótipos intermediários deveriam ser encontrados ainda que em baixa frequência; a segunda explicação seria a ocorrência de contato secundário entre as linhagens, que neste caso parece ser mais plausível.

Em nossas análises, a hipótese mais plausível também seria a de contato secundário entre as linhagens mitocondriais que estão separadas por muitos passos mutacionais ($A \times B = 12$ passos, $A \times C = 22$ passos e $B \times C = 33$ passos), e apesar do grande número de indivíduos amostrados por trecho (variando de 24 a 39 indivíduos) nenhum haplótipo intermediário foi encontrado. Desta forma, aceitamos aqui a possibilidade de contato secundário entre as três linhagens mitocondriais. A julgar pelo

grande número de passos mutacionais entre as linhagens e a grande distância entre as mesmas, estas poderiam ter se originado em três populações originalmente isoladas.

Em situação quase oposta, as amostras de P1 a P5 exibem baixos níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica e, segundo parâmetros propostos por Grant e Bowen (1998), suas arquiteturas genéticas indicam períodos de baixo tamanho efetivo da população dentro últimos milhares ou dezenas de milhares de anos. Como Padhi (2013b), que estudando uma espécie não migradora de siluriforme na Flórida (USA), também encontrou índices de diversidade genética da região Controle do DNA mitocondrial relativamente baixos e os atribuiu à uma expansão populacional após um período de retração da população em um refúgio glacial.

Altos valores de diversidade haplotípica associados a baixos valores de diversidade nucleotídica foram encontrados para *P. corruscans* e *P. reticulatum*, estudando-se a região *D-loop*, neste caso a ocorrência de um *bottleneck* seguido de expansão populacional foi igualmente proposta pelos autores baseando-se também nos critérios apontados por Grant e Bowen (1998) (BIGNOTTO et al., 2009).

Os testes de neutralidade seletiva, podem também detectar a ocorrência de eventos demográficos na população, pois gargalos populacionais e eventos fundadores também podem causar um $D < 0$, imitando os efeitos de uma varredura seletiva (TEMPLETON, 2011), o teste F_s de F_u , que é considerado muito mais sensível à expansões demográficas em populações, resultando em grandes valores negativos, e é geralmente empregado para testar se o resultado do teste de Tajima (D) é resultante de uma expansão populacional (GARCEZ, CALCAGNOTTO e ALMEIDA-TOLEDO, 2011). As amostras P1, P2, P3 e P4 apresentaram valores negativos e significativos para os testes D ; estes valores foram também testados pelo teste F_s e novamente foram negativos e significativos, com exceção da amostra 04, indicando que nestas populações pode ter ocorrido expansão populacional.

Desta forma, as amostras de P1 a P3 reúnem evidências tanto na análise dos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, como para os testes de neutralidade indicando para uma possível expansão populacional nestas localidades. A amostra 04 apesar de não possuir um valor de F_s significativo, apresentou um D negativo e significativo além da evidência oriunda da comparação entre h e π , a amostra 05 que

não apresentou nenhum valor nos testes de neutralidade significativos, ainda assim apresentou valores baixos de diversidade haplotípica e nucleotídica que pode indicar a expansão populacional. Assim, podemos inferir que os trechos de P1 a P5 tenham sido colonizados mais recentemente (milhares ou dezenas de milhares de anos), enquanto que os trechos do baixo rio Laranjinha, são zonas de contato secundário entre linhagens oriundas de diversas localidades (outros rios da mesma bacia, ou outras bacias). Estas evidências de expansão populacional e contatos secundários reforçam as sugestões de Holanda Carvalho (2011) onde após análise das topologias geradas pelas quatro diferentes linhagens mitocondriais infere que uma série de eventos de expansão e colonização podem ter ocorrido pelos diferentes filogrupos ao longo de diferentes épocas.

De maneira complementar, nas análises de microssatélite, as amostras P1, P4, P5 e P7 apresentaram evidências de possíveis reduções recentes no tamanho efetivo populacional, detectado por meio do excesso de heterozigosidade. A amostra 04 foi a única a apresentar evidência de redução populacional para dois modelos evolutivos (IAM e SMM). Geneticamente, sabemos que as consequências de um *bottleneck* ou efeito do fundador se manifestam de maneira semelhante na população, já que ambos representam reduções no tamanho populacional. Assim, os dados de *D-loop* e SSR parecem apontar para uma colonização posterior da região localizada à montante do rio Laranjinha.

Os menores valores de diversidade haplotípica e nucleotídica são encontrados próximos à nascente do rio Laranjinha (amostras P1, P2 e P3), enquanto que os trechos da porção média (amostras P4 e P5) possuem valores intermediários e as amostras da porção baixa (P6 e P7) possuem os maiores valores de h e π , os menores índices de diversidade haplotípica e nucleotídica das amostras próximas à montante, podem ser em decorrência de que estas populações tenham sido fundadas mais recentemente, conforme dito anteriormente, estas localidade possuem índices de diversidade do genoma mitocondrial, muito inferior ao dos microssatélites, entretanto, sabemos que após eventos de redução demográfica os microssatélites recuperam-se muito mais rapidamente do que os genoma mitocondrial (MACCUSKER e BENTZEN, 2010), desta forma, o tempo transcorrido depois do evento fundador destas populações, que possui

efeitos semelhantes à um *bottleneck*, foi suficiente o bastante para recuperar a diversidade dos microssatélites, mas ainda não para o genoma mitocondrial.

Uma das possibilidades levantadas para a colonização recente desta região do rio, é que, assim como foi encontrado por Holanda Carvalho (2011) em algumas localidades, aqui também existem possibilidades de captura de cabeceira entre tributários dos rios Laranjinha e Tibagi; neste caso, a região entre as amostras P3 e P4 (Figura 1). A amostra P3 (Figueira) apresentou uma grande quantidade de fluxo gênico recente principalmente em direção as amostras P2, P4 e P5, o mesmo pode ter ocorrido após à captura de algum (uns) afluente (s) de um tributário do rio Tibagi, entretanto, esta hipótese ainda precisa ser confirmada por meio da realização de coletas e análises genéticas que possam confirmar esta hipótese, uma vez que a análise de inferência bayesiana obtida pelo programa Bayesass é referente ao fluxo gênico recente. No entanto, pode haver concordância entre fluxo gênico contemporâneo e histórico em espécies não migradoras e filopátricas (CHIUCCHI e GIBBS, 2010).

A amostra P2, chama a atenção principalmente quanto à baixa diversidade genética. É a única que não possui alelos de microssatélite ou haplótipos mitocondriais privados, também apresenta os menores valores de diversidade haplotípica e nucleotídica e o menor número de haplótipos. Estes dados podem significar a existência de um *bottleneck* nesta amostra. O que estaria de acordo com os dados colhidos para outras espécies no mesmo local, como é o caso de *Brycon nattereri* (Capítulo 5 – presente tese) e *Geophagus brasiliensis* (FERREIRA, 2013), onde os dados também evidenciam possíveis *bottlenecks*.

Hollanda Carvalho (2011) acredita que as diferentes linhagens mitocondriais se formariam por sucessivos eventos de isolamento geográfico entre elas após um grande movimento de colonização; esta expansão seria responsável pelo contato secundário entre as linhagens, e estudando *H. ancistroides* no Alto rio Paraná encontrou quatro linhagens mitocondriais diferentes para o gene ATP sintase 6,8, que divergiam entre 1,6% e 2,3%, comparando estes valores às variações intra e interespecíficas dentro do gênero os autores concluem que as diferentes linhagens poderiam tratar-se de diferentes espécies.

Entretanto, nem sempre a existência de duas linhagens mitocondriais em simpatria indica a existência de espécies diferentes. Borba et al. (2013) estudando *H. strigaticeps* em dez localidades da bacia do Alto rio Paraná, encontrou duas linhagens de haplótipos mitocondriais do gene da ATP sintase 6,8 que apresentaram 1% de divergência; entretanto, os resultados das análises filogenéticas não suportaram a hipótese da existência de espécies crípticas.

As diferenças quanto as divergências existentes entre as linhagens analisadas à partir da região *D-loop* e ATP sintase 6,8 podem ser explicadas pelas diferentes taxas de evolução, pois a região *D-loop* possui taxas de substituição e, portanto, diferenciação muito superiores (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001; BONI et al., 2011)

Em uma espécie de siluriformes, amplamente distribuída em rios dos EUA, a análise da região *D-loop* revelou a existência de seis linhagens diferentes, onde mesmo com valores de distância genética entre as linhagens variando entre 1,2% e 4,6% os autores não acreditam que o fluxo gênico entre as linhagens tenha sido totalmente interrompido (PADHI, 2013a). Em outro estudo com uma espécie de siluriformes relativamente sedentária, quatro linhagens mitocondriais de *D-loop* foram encontradas e as distâncias genéticas entre as linhagens variaram entre 2,04% a 3,24% (PADHI, 2013b). Ainda, considerando a região *D-loop* entre as espécies *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*, os autores encontraram cerca de 8,5% de distância genética, o que é aproximadamente oito vezes maior do que a distância intraespecífica (BIGNOTTO et al., 2009).

Apesar de Hollanda Carvalho (2011) acreditar que, devido os grandes valores de distância entre os filogrupos, e à grande variação intra e inter-específica dentro do gênero, as quatro linhagens mitocondriais possam representar diferentes espécies, não acreditamos, que especificamente no rio Laranjinha, apesar da existência de três linhagens mitocondriais diferentes, existam espécies crípticas de *H. ancistroides*. Se levarmos em consideração que a região *D-loop* possui uma velocidade de evolução maior do que a ATP sintase 6,8 (BONI et al., 2011; FISCHER et al., 2013), deveríamos ter encontrado diferenças muito maiores entre as linhagens do que 2,4%, 3,1% e 3,4%. Borba et al., (2013) em um trabalho com o gênero *Hypostomus* não consideraram a ocorrência de espécies crípticas mesmo tendo observado 1% de divergência para ATP

sintase 6,8, que evolui muito mais lentamente do que *D-loop*, e em uma área de ocorrência muito maior.

Entretanto, a região *D-loop* devido à sua grande velocidade de substituições certamente não é a mais adequada para se estudar a separação de espécies, e aqui apesar da análise do mtDNA indicar a existência de diferentes linhagens, as análises de DNA nuclear, por meio dos marcadores SSR, deixa evidente a existência de fluxo gênico entre elas, e portanto, não tratam-se de unidades evolutivas diferentes e nem de espécies diferentes por nenhum dos conceitos conhecidos. Por exemplo, segundo o Conceito Biológico de Espécie (CBE) para que duas amostras sejam consideradas espécies diferentes é necessário que haja o isolamento reprodutivo entre elas e este funciona como o indicativo de que duas espécies constituem unidades evolutivas independentes (FREEMAN, HERRON, 2009).

Hollanda Carvalho (2011), já alertava que para se confirmar que os diferentes filogrupos encontrados para ATP sintase 6,8 tratavam-se de fato de espécies diferentes seria necessário estudar mais a fundo as amostras onde os filogrupos ocorriam em simpatria por meio de marcadores codominantes nucleares, como é o caso dos microssatélites.

Nossos dados de microssatélites evidenciam que dos 64 alelos encontrados nos indivíduos pertencentes às linhagens B e C, apenas dois não ocorrem também na linhagem A. Ainda, os indivíduos que possuem estes alelos privados à linhagem C são heterozigotos, e o outro alelo é compartilhado também com as demais linhagens. Estes grande compartilhamento de alelos, indicam a existência de fluxo gênico, mostrando que as diferentes linhagens mitocondriais não estão isoladas reprodutivamente.

Como o DNA mitocondrial via de regra possui herança matrilineal e ausência de recombinação não há “mistura” quando duas linhagens ou populações se encontram, ou seja, fica muito difícil investigar por meio dele se duas amostras que ocorrem em simpatria estão isoladas reprodutivamente e portanto tratam-se de unidades evolutivas independentes. Desta forma, o DNA mitocondrial pode nos indicar a quantidade de diferenças acumuladas no período em que permaneceram isoladas, mas não pode indicar se estas diferenças foram suficientes para isolar reprodutivamente as amostras que agora estão em simpatria. Por outro lado, os marcadores nucleares, que são recebidos de

ambos os parentais e podem sofrer duas grandes misturas, seja na recombinação meiótica, seja na reprodução sexuada e podem evidenciar a ocorrência de troca de material genética entre as diferentes linhagens.

Portanto, no rio Laranjinha, as linhagens mitocondriais não constituem espécies diferentes, entretanto isso não significa que em outros locais isso não possa ocorrer, os pontos em que as diferentes linhagens ocorrem em simpatria oferecem boas oportunidades para tais estudos.

Adicionalmente, análises morfológicas preliminares não foram capazes de encontrar características externas que possam configurar os indivíduos das diferentes linhagens como espécies diferentes. E isto, podem se configurar em evidências adicionais de que as diferentes linhagens também não podem constituir espécies diferentes segundo o Conceito Morfológico de Espécie que leva em conta a análise de diferenças fenotípicas para a identificação de morfoespécies (FREEMAN e HERRON, 2009)

4.2 Estrutura Genética

As análises realizadas pelos diferentes marcadores, microssatélite e *D-loop*, utilizando diferentes ferramentas estatísticas apontaram para a divisão do rio Laranjinha em dois grandes grupos: o grupo (Baixo/Foz) contendo as amostras P6 e P7, que representam a região mais próxima à foz do rio e o grupo (Nascente/Médio) contendo as amostras P1, P2, P3, P4, P5 que correspondem às amostras da região de cabeceira e da porção média do rio.

As comparações de F_{ST} envolvendo amostra dos dois grupos distintos (Nascente/Médio x Baixo/Foz) sempre apresentaram, de acordo com escala proposta por Wright (1978), de moderada a grande diferenciação genética, enquanto que comparações dentro dos grupos apresentavam valores de baixa a moderada diferenciação genética. A análise por meio de R_{ST} apresentou um padrão semelhante, e sempre em que as populações entre os dois grupos foram comparadas observou-se uma estruturação significativa de moderada a grande, sendo que algumas comparações

dentro dos grupos não foram ao menos significativas. As análises do estimador Φ_{ST} , para os dados do marcador *D-loop*, também confirmam a existência destes dois grupos, todas as comparações entre os grupos foram significativas de moderada a grande, entretanto dentro dos grupos apenas uma comparação entre as amostras foi significativa e indicava baixa diferenciação. A análise de agrupamentos bayesianos corrobora os dados acima, apresentando claramente os mesmos dois grupos distintos.

A estruturação das populações dentro do rio Laranjinha não foi algo inesperado já que estamos tratando de uma espécie relativamente generalista na ocupação de habitats, não migradora e com cuidado parental, espécies com tais características geralmente apresentam-se estruturadas em sua área de ocorrência, conforme observado por Sofia et al. (2008) em um estudo realizado por meio de marcadores RAPD em um ribeirão urbano, dentre os quatro trechos estudados pelos autores, apenas uma comparação entre os trechos mais próximos (0,76 km de distância) não apresentou valores de Φ_{ST} significativos todas as demais comparações apresentaram diferenciação genética moderada e significativa, ainda que a maior distância entre os trechos amostrais seja inferior a 7 km, mostrando que estes animais, de uma maneira geral, deslocam-se muito pouco dentro do corpo d'água, Adamson, Hurwood e Mather (2012) também observaram este padrão em uma espécie não migradora na bacia o rio Mekong.

A observação do dendrograma de similaridade também confirma esta divisão entre estes dois grupos e ainda aponta uma outra subdivisão dentro do grupo Nascente/Médio: o grupo Nascente agrupando as amostras P1 e P2 e o grupo Médio reunindo as amostras P3, P4 e P5. Este padrão encontrado no dendrograma já havia sido encontrado por Sofia et al. (2008) para *H. ancistroides* em um ribeirão urbano, mostrando que as amostras mais próximas exibem maior similaridade, e que naquela situação a região amostral também é claramente distinta em dois grupos.

O cenário acima, é corroborado pelo teste de correlação de Mantel, pois as estruturações genéticas por meio do F_{ST} ou R_{ST} apresentaram uma correlação significativa com a distância geográfica, apontando que a diferenciação genética em *H. ancistroides* segue o padrão do isolamento por distância, conforme apontado por Hollanda Carvalho (2011), ou ainda um modelo de *stepping Stones* e desta forma poderia manter algum fluxo gênico dentro do rio. Apesar, de que o próprio Hollanda

Carvalho (2011) alerta para o fato de que mesmo tratando-se de uma espécie não migradora, *H. ancistroides* em outros momentos certamente realizou grandes movimentos migratórios.

As comparações entre as amostras vizinhas geralmente apresentaram uma estruturação genética pequena, no caso do F_{ST} , e por menor que fossem estas estruturações sempre foram significativas, o que é coerente com os hábitos sedentários desta espécie.

A análise da AMOVA também apresentou grande coerência com os dados apresentados anteriormente por Sofia et al. (2008), que encontrou cerca de 9,15% da variância contida entre as populações e 90,85% da variabilidade dentro das populações, demonstrando que independente do marcador SSR, *D-loop* ou RAPD, e do tamanho da área amostral ou do corpo d'água, de uma maneira geral, aproximadamente, 10% da variabilidade genética fica contida entre as populações, evidenciando que esta espécie via de regra se encontrará estruturada em diversos grupos. Esta informação é de extrema importância para a conservação da espécie, pois mostra que é necessário preservar toda a área de ocorrência para que possamos preservar toda a variabilidade genética existente na espécie, não bastaria portanto preservar uma pequena área da bacia, conforme apontado por Solé-Cava e Cunha (2012).

Por outro lado, ainda que pareça paradoxal, a análise de estimativa de fluxo gênico bayesiana que é atualmente utilizada com eficiência para determinação de fluxo gênico entre populações naturais (PALSTRA et al., 2007; CHIUCCHI e GIBBS, 2010; LAMPHERE e BLUM, 2012), indicou que a amostra P3 contribui de maneira significativa na composição da diversidade genética das amostras P2, P4 e P5 e em menor proporção para a amostra P1 e P6. A amostra P7 praticamente não recebe migrantes, entretanto contribui com a variabilidade da amostra P6. Estes dados confirmam a existência de fluxo gênico dentro dos grupos Nascente/Médio e Baixo/Foz, mas não entre estes. Dentro do grupo (Nascente/Médio) a amostra P1 parece estar mais isolada do restante.

Nosso trabalho evidencia a existência de duas grandes populações de *Hypostomus ancistroides* no rio Laranjinha, bem como a existência de subpopulações dentro destes grandes grupos, também evidencia a existência de três linhagens

mitocondriais diferentes que demonstram a colonização desta espécie no rio Laranjinha, não deu-se em um evento único, mas pode ter ocorrido em diferentes momentos com animais oriundos de diferentes locais e possivelmente por diferentes rotas.

A realização de trabalhos que permitam entender como se dá a distribuição e estruturação da diversidade genética dentro de uma bacia hidrográfica, utilizando-se para tanto espécies não migradoras deveriam ser utilizadas, para monitorar a diversidade genética de bacias hidrográficas ao longo do tempo. Entende-se a preferência pelas espécies migradoras, pois quase sempre são espécies de grande porte e com grande valor econômico e representam importantes recursos pesqueiros, também, o impacto dos barramentos na interrupção de rotas migratórias parecem ser de mais fácil entendimento, entretanto as espécies não migradoras, que representam a maior parte das espécies que compõe as bacias hidrográficas (AGOSTINHO et al, 2007), e até o momento, pouco se sabe sobre o fluxo gênico nestas espécies e o efeito destes barramentos sobre tais populações. Ainda, a despeito do seu grande número, quase nunca se prevê estratégias e ações para manejar e monitorar estas populações de peixes sedentários.

5 CONCLUSÕES

- Diante dos resultados apresentados, podemos verificar a importância de se utilizar espécies não migradoras para entender como se distribui a variabilidade genética dentro das bacias hidrográficas. Principalmente em ambientes sujeitos a fragmentação, ou à implantação de empreendimentos hidroelétricos, uma vez que as decisões acerca da implantação e manejo destes empreendimentos até então são tomadas quase exclusivamente sobre as espécies migradoras;
- Além das populações encontrarem-se estruturadas umas em relação as outras, ainda existe uma clara divisão entre as regiões da Nascente / Média / Foz;
- A diversidade genética encontra-se distribuída ao longo de todo o rio Laranjinha, pois além da estruturação entre as populações e regiões do rio, também ocorrem alelos e haplótipos privados e quase todas as amostras;

- Apesar de apresentar três linhagens mitocondriais diferentes, *H. ancistroides* constitui uma única espécie no rio Laranjinha;
- Os dados apresentados permitirão iniciar um programa de monitoramento da diversidade genética de uma espécie de peixe ao longo do rio Laranjinha, uma ação inédita e que permitirá detectar, se houver, perda de diversidade genética face alguma interferência antrópica;
- Mesmo se tratando de uma espécie não migradora, fica evidente a existência de fluxo gênico dentro do rio. Isto, mostra o impacto que empreendimentos hidrelétricos podem gerar sobre espécies não migradoras que nunca são priorizadas em estudos e relatórios de impactos ambientais, tampouco em ações de manejo. Também alerta para a necessidade de se estudar os impactos sobre todo um sistema hidrográfico, pois fica evidente que em diversos períodos as espécies mesmo não migradoras realizam deslocamentos dentro dos sistemas hidrográficos;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, E. A. S.; HURWOOD, D. A.; MATHER, P. B. Insights into historical drainage evolution based on the phylogeography of the chevron snakehead fish (*Channa striata*) in the Mekong Basin. **Freshwater Biology**, v.57, p. 2211–2229: 2012
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Eduem – Maringá, 501p.: 2007
- AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; PETRY, A. C.; GOMES, L. C.; JÚLIO JR, H. F. Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health & Management**. v. 10(2), p.174–186: 2007
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p. 70-78: 2005
- AGUIRRE-PABÓN, J.; BARANDICA, J. N.; GARCÍA, L. C. Mitochondrial DNA variation of the bocachico *Prochilodus magdalenae* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Magdalena River Basin, Colombia. **Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems**: 2013
- ALLENDORF, F. W.; SEEB, L. W. Concordance of genetic divergence among sockeye salmon populations at allozyme, nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers. **Evolution**, v. 54, n. 2, p. 640-651: 2000.
- 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, **Brazilian Journal of Zoology**, v. 253, p. 113-120: 2001
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p. 403-410: 1990
- ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica. **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 3ª Edição. Brasil: 2008
- ASHIKAGA, F. Y. Estudo da estrutura genética de *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) das escadas para transposição de peixes do complexo Canoas – Rio Paranapanema. Dissertação apresentada ao curso 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. 2008
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37 - 48: 1999
- BARLETTA, M.; JAUREGUIZAR, A. J.; BAIGUN, C.; FONTOURA, N. F.; AGOSTINHO, A. A.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; TORRES, R. A.; JIMENES-SEGURA, L. F.; GIARRIZZO, T.; FABR´E, N. N.; BATISTA, V. S.;

LASSO, C.; TAPHORN, D. C.; COSTA, M. F.; CHAVES, P. T.; VIEIRA, J. P.; CORRÊA, M. F. M. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. **Journal of Fish Biology**, n.76, p. 2118 – 2176: 2010

BIG – ANEEL. Banco de Informações de Geração. Site: <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.cfm> - acessado em 24/10/2013 às 10h41: 2013

BIGNOTTO, T. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; MANIGLIA, T. C.; BONI, T. A.; LUCIO, L. C.; GOMES, V. N.; PRIOLI, R. A.; OLIVEIRA, A. V.; JÚLIO-JUNIOR, H. F.; PRIOLI, L. M. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n.2, p. 681-689: 2009

BONI, T. A.; PADIAL, A. A.; PRIOLI, S. M. A. P.; LUCIO, L. C.; MANIGLIA, T. C.; BIGNOTTO, T. S.; PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, R. A.; PRIOLI, A. J. Molecular differentiation of species of the genus *Zungaro* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Amazon and Paraná-Paraguay River basins in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 2795-2805: 2011

BORBA, R. S.; ZAWADZKI, C. H.; OLIVEIRA, C.; PERDICES, A.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; ALVES, A. L. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n.1, p.111-116: 2013

BRITTO, S. D. C.; CARVALHO, E. D. Ecological attributes of fish fauna in the Taquaruçu reservoir, Paranapanema river (upper Paraná, Brazil): composition and spatial distribution. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 18, n. 4, p. 377-388: 2006.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do pantanal, manual de identificação**. Editora Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF. 2ª edição. 227p: 2007

CARDOSO, Y. P.; BRANCOLINI, F.; PROTOGINO, L.; LIZARRALDE, M. Actinopterygii, Siluriformes, Loricariidae, *Hypostomus aspilogaster* (Cope, 1894). Distribution extension and first record for Argentina. **Check List**. v. 7, n. 5, p. 596 - 598: 2011

CARVALHO-COSTA, L. F., HATANAKA, T., & GALETTI JR, P. M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 377-380: 2008

CASATTI, L. Fish assemblage structure in a first order stream, southeastern Brazil: longitudinal distribution, seasonality, and microhabitat diversity. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 1, p. 75 – 83: 2005

- CASATTI, L. Ichthyofauna of two stream (silted and reference) in the Upper Paraná river basin, southeastern Brasil. **Brazilian Journal of Biology.**, v. 64, n. 4, p. 757-765: 2004
- CASATTI, L. Alimentação dos peixes em um riacho do Parque Estadual do Morro do Diabo, bacia do Alto rio Paraná, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 2, n. 2, p. 1 – 14: 2003
- CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; MELO, A. L. A.; MARTINS, L. S. F.; FERREIRA, K. M.; GIBRAN, F. Z.; BENINE, R. C.; CARVALHO, M.; RIBEIRO, A. C.; ABREU, T. X.; BOCKMANN, F. A.; DARDIS, G. Z. P.; STOPIGLIA, R.; LANGEANI, F. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**. v. 4, n. 1, p. 1 - 12: 2004.
- CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; FERREIRA, K. M.; RIBEIRO, A. C.; BENINE, R. C.; DARDIS, G. Z. P.; MELO, A. L. A.; STOPIGLIA, R.; ABREU, T. X.; BOCKMANN, F. A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F. Z.; LIMA, F. C. T. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica**. v. 3, n. 1, p. 1 – 14: 2003
- CHIUCCHI, J. E.; GIBBS, H. L. Similarity of contemporary and historical gene flow among highly fragmented populations of an endangered rattlesnake. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 24, p. 5345-5358: 2010
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014: 1996
- COSTA, A. D. A.; FERREIRA, D. G.; SILVA, W. F.; ZANATTA, A. S.; SHIBATTA, O. A.; GALINDO, B. A. Fishes (Osteichthyes: Actinopterygii) from the Penacho stream, upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. **Check List**, v. 9(3), p. 519–523: 2013
- CUNICO, A. M.; GRAÇA, W. J.; AGOSTINHO, A. A.; DOMINGUES, W. M.; LATINI, J. D. Fish, Maringá urban streams, Pirapó river drainage, upper Paraná river basin, Paraná State, Brazil. **Check List**, v. 5, p. 273-280: 2009
- DeWOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p. 461 – 473: 2000
- DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A. H.; GESSNER, M. O.; KAWABATA, Z. I.; KNOWLER, D. J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R. J.; PRIEUR-RICHARD, A. H.; SOTO, D.; STIASSNY, M. L. J.; SULLIVAN, C. A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews**, v. 81, p. 163–182: 2006

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**. v. 4, n. 2, p. 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7: : 2012

ENDO, K. S.; MARTINEZ, E. R. M.; ZAWADZKI, C. H.; PAIVA, L. R. S.; JÚLIO-JÚNIOR, H. F. Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 2, p. 181-189: 2012

ESCHMEYER, W. N. (ed). 2014 CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES. Acessado em > <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Capturado em 20/02/2014.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620: 2005

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p. 564-567: 2010

FERREIRA, D. G. Análise genética da espécie Neotropical *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes: Cichlidae). Dissertação apresentada ao curso 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. 2013

FERREIRA, M. G.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN. Brasília: 1995

FISCHER, C.; KOBLMÜLLER, S.; GÜLLY, C.; SCHLÖTTERER, C.; STURMBAUER, C.; THALLINGER, G. G. Complete Mitochondrial DNA Sequences of the Threadfin Cichlid (*Petrochromis trewavasae*) and the Blunthead Cichlid (*Tropheus moorii*) and Patterns of Mitochondrial Genome Evolution in Cichlid Fishes. **PLoS ONE**. v. 8, n. 6: e67048.doi:10.1371/journal.pone.0067048: 2013

FLUXUS TECHNOLOGY Ltd - <http://www.fluxus-engineering.com>

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. J. D.; BRISCOE, D. D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. 2ª ed. Cambridge University Press, 618 p: 2010

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons Ltd, England: 2005

FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Análise Evolutiva**. 4ª ed. Editora Artmed – Porto Alegre – RS, 848p:2009

FROESE, R.; PAULY, D. Editors. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (12/2013): 2013

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

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

GOMES, P. C.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; JUNIOR, D. P. S.; POVH, J. A.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P. Genetic diversity of *Salminus brasiliensis* (Characiformes: Characidae) collected in the passage ladder of the Canoas I hydropower plant in the Paranapanema River, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1421-1432: 2013

GOUDET, J. FSTAT a computer package for PCs which estimates and tests gene diversities and differentiation statistics from codominant genetic markers. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>: 2002

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Editora EDUEM. Maringá – PR. 241p: 2007

GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines e anchovies and lessons for conservation. **The Journal of Heredity**. v.89, n.5, p.415-426: 1998

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98: 1999

HOLLANDA CARVALHO, P. Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae). Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Biologia-Genética. 2011

IERVOLINO, F.; RESENDE, E. K. HILSDORF, A. W. S. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA *D-loop* region: Implications for fishery management. **Fisheries Research**, v.101, p. 27–31: 2010

LAMPHERE, B. A.; BLUM, M. J. Genetic estimates of population structure and dispersal in a benthic stream fish. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 21, n. 1, p. 75-86: 2012

LANGEANI, F.; CASTRO, R. M. C.; OYAKAWA, O. T.; SHIBATTA, O. A.; PAVANELLI, C. S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 1-17: 2007

LANGEN, K.; SCHWARZER, J.; KULLMANN, H.; BAKKER, T. C.; THÜNKEN, T. Microsatellite support for active inbreeding in a cichlid fish. **PloS one**, v. 6, n. 9, e24689: 2011

LEUZZI, M. S. P.; DE ALMEIDA, F. S.; ORSI, M. L.; SODRÉ, L. M. K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 355 - 362: 2004

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

LOPERA-BARRERO, N. M.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; GOMES, P. C.; JACOMETO, C. B.; LOPES, T. S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigación Agraria**. v. 35, n. 1, p. 65-74: 2008

LOPES, C. M.; ALMEIDA, F. S. D.; ORSI, M. L.; BRITTO, S. G. D. C.; SIROL, R. N.; SODRÉ, L. M. K. Fish passage ladders from Canoas Complex- Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis*(Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 131-138: 2007

LOWE, T. M.; EDDY, S. R. "tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence". **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 955 - 964: 1997

MANCERA-RODRÍGUEZ, N. J.; MARQUEZ, E. J.; HURTADO-ALARCÓN, J. C. Uso de citogenética y técnicas moleculares en estudios de diversidad genética en peces colombianos – Cap. 06, p. 237 – 312. In: ALBEIRO, L. H. **Biología Molecular Aplicada a la producción Animal y la Conservación de Especies Silvestres**. Editorial Universidad Nacional de Colombia: 2013

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

MCCUSKER, M. R.; BENTZEN, P. Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes. **Molecular Ecology**, v.19, p. 4852 – 4862: 2010

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA)**: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data Ver. 1.3. : 1997. Available via <http://bioweb.usu.edu/mpmbio>.

MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1855 –1867: 2003

NILSSON, C.; REIDY, C.A.; DYNESIUS, M.; REVENGA, C. Fragmentation and flow regulation of the world's large river systems (2005). **Science**. v. 308, p. 405–408. Source: GWSP Digital Water Atlas (2008). Map 25: River Fragmentation by Dams (V1.0). Available online at <http://atlas.gwsp.org>."

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 81-100: 2009

ORSI, M. L. **Estratégias reprodutivas de peixes da região média-baixa do rio Paranapanema, reservatório de Capivara**. Editora Edgard Blucher. São Paulo – SP: 2010

PADHI, A. Genetic evidence of multiple matrilineal lineages of the channel catfish, *Ictalurus punctatus* in North America. **Conservation Genetics**: 2013a. DOI 10.1007/s10592-013-0479-6

PADHI, A. Contrasting patterns of genetic diversity between the northern and southern populations of yellow bullhead catfish, *Ameiurus natalis* in North America. **Aquatic Ecology**: 2013b. DOI 10.1007/s10452-013-9449-9

PALSTRA, F. P.; O'CONNELL, M. F.; RUZZANTE, D. E. Population structure and gene flow reversals in Atlantic salmon (*Salmo salar*) over contemporary and long-term temporal scales: effects of population size and life history. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 21, p. 4504-4522: 2007

PAULA, F. M. Diversidade genética de *Prochilodus Lineatus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do Complexo Canoas - Rio Paranapanema. Dissertação apresentada ao curso 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. 2006

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENEALOX 6: genetic analysis in Excel - Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** v. 6, p. 288-295: 2006

PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, n. 2, p. 215-225: 2009

PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P. D.; GALETTI JR, P. M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 1039-1050: 2008

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959: 2000

- RAMOS, J. V. B.; SODRÉ, L. M. K.; ORSI, M. L.; ALMEIDA, F. S. Genetic diversity of the species *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes) in the Canoas Complex - Paranapanema River. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 821 – 828: 2012
- 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
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre (RS). EDIPUCRS. 742p: 2003
- RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225: 1989
- SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 33 –44: 2007
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234: 2000
- SHIBATTA, O. A.; GEALH, A. M.; BENNEMANN, S. T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 125 – 134: 2007
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v.10, p. 407– 417: 2001
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457-462: 1995
- SOFIA, S. H.; GALINDO, B. A.; PAULA, F. M.; SODRÉ, L. M. K.; MARTINEZ, C. B. R. Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p. 317-323 : 2008
- SOFIA, S. H.; SILVA, C. R.; GALINDO, B. A.; ALMEIDA, F. S.; SODRE, L. M.; MARTINEZ, C. B. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. **Hydrobiologia**, v. 553, n. 1, p. 245-254: 2006
- SOLÉ-CAVA, A. M.; CUNHA, H. A. A genética e a conservação da natureza. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia Molecular e Evolução** (Eds.). 2ª Ed. Ribeirão Preto. Editora Holos / Sociedade Brasileira de Genética: 2012
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739: 2011

TELLES, M. P. C.; RESENDE, L. V.; BRONDANI, R. P. V.; COLLEVATTI, R. G.; COSTA, M. C.; JÚNIOR, N. S. Isolation and characterization of microsatellite markers in the armored catfish *Hypostomus gymnorhynchus* (Loricariidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1770-1774: 2010

TEMPLETON, A. R. **Genética de Populações e teoria microevolutiva**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto – SP: 2011

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680: 1994

TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. **1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology** - Ribeirão Preto: 2003

TURNER, T. F.; MCPHEE, M. V.; CAMPBELL, P.; WINEMILLER, K. O. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. **Journal of Fish Biology**, n. 64, p.186–201: 2004

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. F. (2004). Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538: 2004

VIEIRA, D. B.; SHIBATTA, O. A. Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**. v.7, n. 1, p. 57 – 65: 2007

VRIJENHOEK, R. C. Conservation genetics of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v. 53, s. A, p. 394-412: 1998

WANG, C.; LIU, H.; LIU, Z.; WANG, J.; ZOU, J.; LI, X. Mitochondrial genetic diversity and gene flow of common carp from main river drainages in China. **Freshwater Biology**, v. 55, p. 1905 – 1915: 2010

WARD, R. D. Genetics of Fish Populations. Cap. 9. in: HART, P. J. B.; REYNOLDS, J. D. **Handbook of Fish Biology and Fisheries**, v. 1 **Fish biology**. Blackwell Publishing company – USA: 2002

WEBER, C. Subfamily Hypostominae (Armored catfishes) in: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre (RS). EDIPUCRS. P. 351 - 372: 2003

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370: 1984

WILSON, G. A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics**, 163, 1177–1191: 2003

WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations. University of Chicago, Chicago: 1978

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T.J.; XIYAN, J. M. Pop Gene 32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v.1.32. **Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta**, Edmonton, Alberta, Canada, 2000.

ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; DOS REIS, R. E.; MOURA, M. O.; MATEUS, R. P. Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genetica**, v. 123, n. 3, p. 271-283: 2005

4.4 Capítulo 4

IMPORTÂNCIA DE UM TRIBUTÁRIO NA MANUTENÇÃO DOS ESTOQUES DE PEIXES MIGRADORES EM UM SISTEMA COM BARRAMENTOS EM CASCATA.

Este artigo será submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*

Importância de um tributário na manutenção dos estoques de peixes migradores em um sistema com barramentos em cascata

RESUMO

A bacia do rio Paranapanema é um exemplo de desenvolvimento econômico a qualquer custo, neste rio foram construídas 11 usinas hidrelétricas, num sistema de cascata de reservatórios, a maior destas é a UHE de Capivara localizada na porção média do rio Paranapanema, que possui como maiores tributários os rios Tibagi e Cinzas, diversos autores vem apontando a importância destas bacias hidrográficas para a manutenção da diversidade de peixes neste sistema. O rio Laranjinha é o principal tributário do rio das Cinzas e vêm demonstrando sua importância pelo grande número de espécies migradoras já capturadas em seu curso. O presente trabalho teve por objetivo analisar duas amostras de *Prochilodus lineatus* capturadas no rio Laranjinha e na represa de Capivara por meio de marcadores moleculares microssatélite e *D-loop* para verificar a hipótese dos peixes da represa de Capivara utilizarem este afluente em alguma parte do seu ciclo de vida. A análise genética da amostra como um todo revelou índices de diversidade genética compatíveis com os níveis conhecidos para a espécie ($H_0 = 0,577$; $H_e = 0,692$; $h = 0,879$, $\pi = 1,67\%$). Os peixes da represa de Capivara apresentaram índices ligeiramente maiores aos do rio Laranjinha. As análises revelaram a existência de fluxo gênico entre estes dois locais, sendo 0,2820 e 0,1730 a proporção de migrantes no rio Laranjinha e represa de Capivara respectivamente. Os marcadores de microssatélite revelaram baixa estruturação, enquanto os marcadores mitocondriais (*D-loop*) indicaram uma moderada estruturação genética entre as duas populações estudadas. A análise de agrupamentos bayesianos mostrou a existência de um $K=3$, indicando a existência de mais de um estoque genético presente principalmente na represa de Capivara. A ocorrência de haplótipos muito divergentes sem que ocorram intermediários, pode ser explicada tanto pelas características biológicas da espécie, tais como a capacidade de migrar grandes distâncias, como por equívocos nos manejos de estocagens conduzidos na bacia. Os resultados obtidos reforçam a importância da bacia do rio das Cinzas para a manutenção dos estoques do médio Paranapanema e devem ser levados em consideração no manejo desta área.

Palavras-chave: *rota migratória, marcadores moleculares, Prochilodus lineatus, genética de populações.*

1 INTRODUÇÃO

O rio Paranapanema é um dos principais afluentes do rio Paraná, fazendo parte, portanto, do sistema do Alto rio Paraná. O rio Paranapanema possui sua nascente na serra de Paranapiacaba (estado de São Paulo) e percorre aproximadamente 930 km até desaguar no rio Paraná. Em boa parte de sua extensão faz a divisa entre os estados do Paraná e São Paulo e apresenta um desnível de aproximadamente 600 m (DUKE-ENERGY, 2003). Ao longo de sua calha principal possui atualmente 11 usinas hidrelétricas em funcionamento com capacidade para gerar 2.386.756 KW, o que representa aproximadamente 1,9% do total de energia gerada no Brasil e 2,8% da hidroeletricidade (BIG, 2013).

A usina com maior capacidade de geração, UHE Capivara (Escola de Engenharia Mackenzie) com potência instalada de 619 MW, teve sua construção iniciada em 1971 e iniciou a operação em 1977, possui um reservatório de acumulação de 576 km², onde armazena-se em torno de 10,5 bilhões de m³ de água (DUKE-ENERGY, 2013). Em sua margem esquerda este reservatório recebe dois dos principais tributários deste rio, os rios Tibagi e das Cinzas, enquanto que em sua margem direita recebe apenas pequenos tributários de menor porte (HOFFMANN, ORSI e SHIBATTA, 2005; ORSI, 2010), o reservatório de capivara é delimitado em seu trecho superior pela UHE Canoas I e abaixo está localizado o reservatório da UHE Taquaruçu (Figura 1).

Em 1999, com o término da construção do complexo Canoas (Canoas I e II) interrompeu-se o último grande trecho de rio livre de barramento, aproximadamente 200km na porção média da bacia, restando para o reservatório de Capivara, agora delimitado por Canoas I, como últimos trechos lóticos os rios Tibagi e Cinzas (VIANNA e NOGUEIRA, 2008).

Diversos autores têm chamado atenção para a importância de se preservar as bacias dos rios Tibagi e das Cinzas livres de barramentos pois certamente desempenham um papel fundamental na manutenção e reprodução de diversas espécies de peixes no reservatório de Capivara (rio Paranapanema) que necessitam de ambientes lóticos para completarem alguma fase do seu ciclo de vida (DIAS et al., 2004; HOFFMANN, ORSI e SHIBATTA, 2005; PAULA, 2006; LOPES et al., 2007; VIANNA e NOGUEIRA, 2008; ORSI, 2010).

Segundo Hoffmann, Orsi e Shibatta, (2005), como logo à montante da foz do rio das Cinzas na represa de Capivara existe o barramento da UHE Canoas I, este pode ser considerado uma continuação do reservatório de Capivara, contribuindo para a diversidade do trecho amostral localizado na região de sua foz, e demonstrou ter um importante papel na manutenção desta. Considerações muito semelhante à estas podem ser feitas para o rio Tibagi.

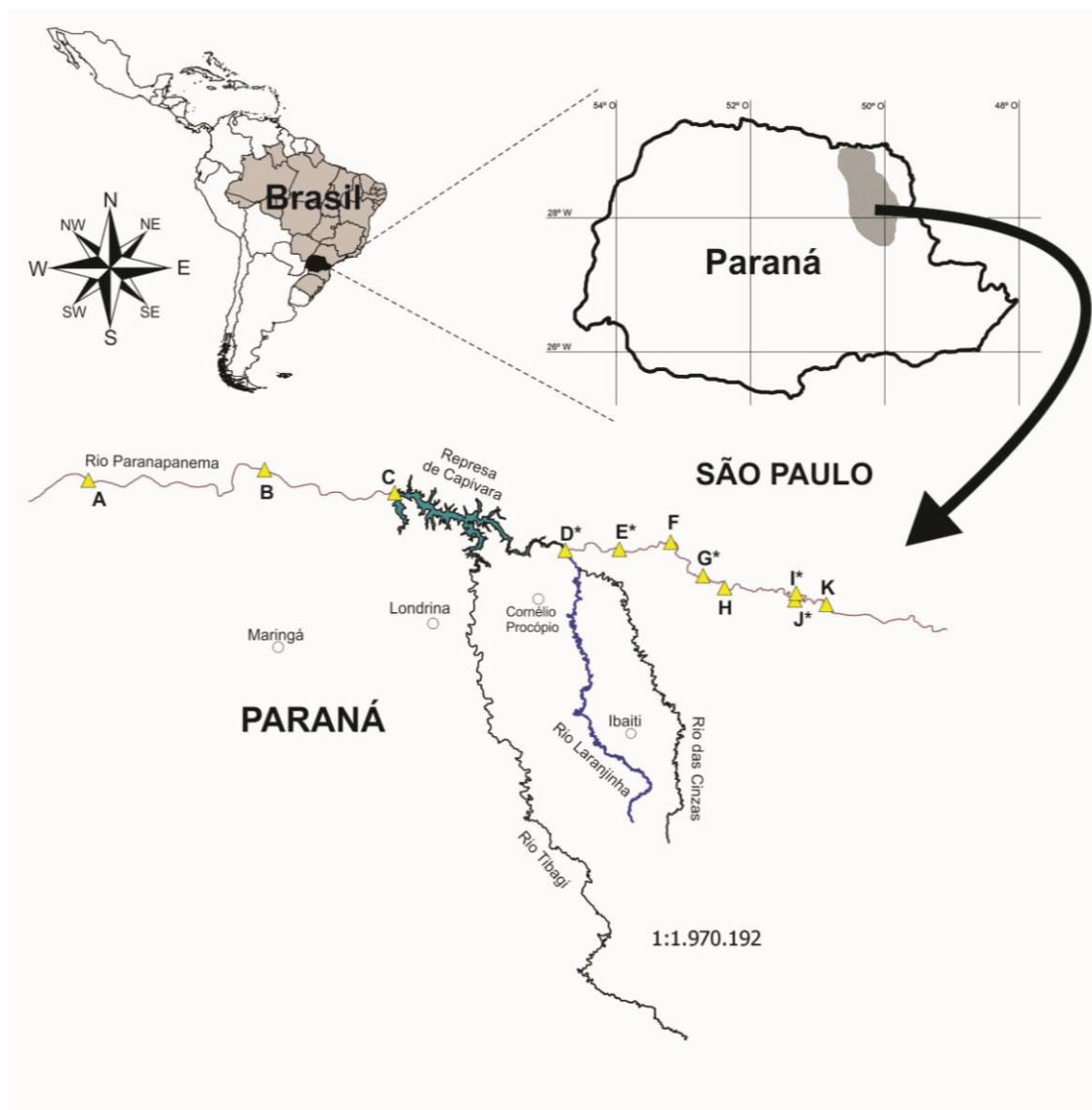


Figura 1 – Área de estudo. Rio Laranjinha destacado em roxo, rio das Cinzas destacado em preto. Triângulos amarelos representam as usinas localizadas no rio Paranapanema: A: UHE Rosana, B: UHE Taquaruçu, C: UHE Capivara, D: UHE Canoas I, E: UHE Canoas II, F: UHE Salto Grande, G: UHE Ourinhos, H: UHE Chavantes, I: UHE Paranapanema, J: UHE Piraju, K: UHE Jurumirim. * UHE que possui escada de transposição para peixes.

O complexo Canoas, é caracterizado segundo Pelicice e Agostinho (2008) como uma “Armadilha Ecológica”, pois retira peixes de um ambiente onde poderiam completar seu ciclo de vida, provavelmente pela presença de tributários na represa de Capivara e os libera em um ambiente mais pobre, onde não há poucas possibilidades de que isto ocorra, podendo assim causar uma depleção dos estoques de peixes na área de influência do reservatório de Capivara.

Em um trabalho realizado nas escadas de transposição do complexo Canoas, que permitem os peixes do reservatório de Capivara ascenderem até o reservatório de Salto Grande, concluiu-se que o melhor manejo para a população de dourados (*Salminus brasiliensis*), seria fechar a escada de Canoas I, localizada entre o reservatório de Capivara e o de Canoas I, permitindo assim que os peixes migradores pudessem procurar os grandes afluentes deste reservatório, os rios Tibagi e das Cinzas, que ainda possuíam grandes trechos lóticos e assim concluir seu ciclo de vida, caso contrário, ascenderiam até o reservatórios de Canoas I e II e onde não há ambientes com características favoráveis para tanto. Assim, a preservação dos tributários Tibagi e das Cinzas são apontadas como prioridades de preservação, acima até mesmo do funcionamento das escadas de transposição do complexo Canoas (LOPES et al., 2007). Um cenário muito semelhante foi também encontrado para outras espécies migradoras tais como, *Leporinus elongatus* (RAMOS et al., 2012) e *Prochilodus lineatus* (PAULA, 2006) no mesmo sistema hidrográfico.

Durante o período conhecido como piracema, onde a maioria dos peixes se reproduz, foram registrados no rio das Cinzas e Laranjinha diversas espécies de peixes com gônadas maduras, além da presença de ovos e larvas, e da presença de espécies migradoras o que é mais um indicativo de que esta bacia pode ser um importante local de reprodução de peixes, inclusive oriundos da represa de Capivara (VIANNA e NOGUEIRA, 2008).

Apesar dos vários trabalhos científicos que chamavam atenção para a importância dos rios Tibagi e das Cinzas, em 2008 iniciaram-se as obras da UHE Mauá construída na porção média do rio Tibagi, com um reservatório de aproximadamente 84 km² e capacidade de 363 MW, que em 2012 iniciou sua geração comercial (CRUZEIRO DO SUL, 2013). Esta situação pode agravar-se ainda mais, pois, apesar da bacia do rio

das Cinzas ainda permanecer livre de grandes barramento, existem, atualmente, 10 registros de projetos de PCHs (Pequena Central Hidrelétrica) para a bacia do rio das Cinzas, sendo seis no rio Laranjinha e quatro no rio das Cinzas (ANEEL, 2013).

No Brasil, as principais atividades de manejo adotadas em reservatórios são a construção de mecanismos de transposição, a estocagem e o controle da pesca, entretanto, a eficiência destas ações é muito questionada para fins de conservação das espécies, pois de maneira paradoxal, muitas vezes estas podem se configurar como ameaças adicionais à ictiofauna (AGOSTINHO e GOMES, 2005; AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007).

Mecanismos bem projetados têm se mostrado eficientes na transposição de peixes para o reservatório, apesar de atuarem de maneira seletiva (AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007; AGOSTINHO et al., 2007b) ou vias de mão única, por permitirem um amplo movimento ascendente e pouco movimento descendente, sejam este por meio de adultos, ovos ou larvas (AGOSTINHO et al., 2007b), em algumas situações específicas podem constituir “armadilhas ecológicas” quando dentre outras coisas, colocam peixes em condições de se reproduzir em áreas à jusante em ambientes totalmente desfavoráveis à montante (PELICICE e AGOSTINHO, 2008). A efetividade da estocagem como é feita na maioria dos casos também é um ponto questionável, pois estas práticas são conduzidas sem acompanhamento genético, utilizando geralmente um número limitado de matrizes, quando comparado ao número de reprodutores em ambiente natural, que podem ter passado por algum tipo de seleção em favor de determinada característica (AGOSTINHO, GOMES e PELICICE, 2007), podendo provocar a introgressão gênica e, dependendo das condições do estoque, comprometer a adaptação dos indivíduos aos locais de ocorrência, diversidade e estrutura genética (LORENZEN, BEVERIDGE e MANGEL, 2012). A estocagem deveria ser conduzida utilizando-se um estoque genético mais apropriado possível, utilizando um grande número de reprodutores de uma população genética local é desejável podendo evitar a endogamia e assegurar a integridade genética local (PIORSKI et al., 2008).

Conforme relatado por Lopes et al. (2008), algumas práticas como a troca de matrizes entre estações de pisciculturas pode ter gerado uma grande similaridade genética entre estações diferentes, outra possibilidade é a origem comum dos estoques.

Apesar do programa de repovoamento em alguns rios brasileiros tomar o cuidado em aplicar ferramentas genéticas no monitoramento de reprodutores e lotes de alevinos, este monitoramento se restringia basicamente à variabilidade genética, e nenhum estudo foi conduzido sobre a estrutura das populações antes da formação dos plantéis de reprodutores ou para se definir o destino dos alevinos.

Em um estudo realizado no Brasil com a espécie *Prochilodus lineatus*, foi detectada uma redução de 85,71% de locos polimórficos nas matrizes para 79,37% nos alevinos, ou seja, uma redução significativa na variabilidade dos estoques em apenas uma geração (LOPES et al., 2008).

Os mecanismos de transposição, lançam alguns indivíduos à montante de barramentos, e estes podem se reproduzir em regiões acima do reservatório, entretanto, ovos, larvas ou indivíduos adultos não retornam para áreas abaixo da barragem o que demonstra como as escadas podem trazer danos às regiões abaixo da barragem (AGOSTINHO et al., 2007b). Devido à ausência, ou negligência de estudos prévios, muitas escadas podem aumentar ainda mais o impacto para o qual foram construídas para mitigar, e a suspensão do funcionamento destas deve ser considerada (AGOSTINHO, GOMES e LATINI, 2004; PAULA, 2006; LOPES et al., 2007).

Por outro lado, sabe-se há muito tempo que muitas espécies utilizam tributários para se reproduzir (VAZZOLER et al., 1997). Mesmo quando os cardumes ao subirem os rios em busca de locais para se reproduzirem se deparam com obstáculos intransponíveis, tais como barramentos, pelo menos uma porção significativa destes pode localizar outros tributários e os utilizar como rotas alternativas (ANTÔNIO et al., 2007). Devido à esta capacidade de localizar rotas alternativas, os mesmos autores alertam sobre o perigo de se construir mecanismos de transposição para peixes em situações onde à montante não existem locais apropriados para a reprodução, e que a transposição de indivíduos deve ser evitada principalmente em situações onde existem tributários à jusante da barragem com condições para que os peixes possam completar seu ciclo de vida.

O rio Laranjinha é o maior tributário do rio das Cinzas, sua foz encontra-se aproximadamente 15 km antes deste desaguar na represa de Capivara. Em um trabalho realizado desde 2007, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao levantamento da

biodiversidade de peixes neste rio, onde já foram registradas diversas espécies de peixes migradores. Tais achados, somados às evidências levantadas por Vianna e Nogueira (2008), quanto à presença de ovos, larvas e indivíduos maduros, e por Hoffmann, Orsi e Shibatta (2005), quanto à presença de indivíduos migradores próximos à sua foz, nos fazem crer que a bacia do rio das Cinzas realmente desempenha um papel fundamental na manutenção da biodiversidade do rio Paranapanema.

Dentre as espécies migradoras que nosso grupo já capturou dentro do rio Laranjinha, uma das mais abundantes foi *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837), popularmente conhecida como curimba. Exemplares desta espécie foram capturados até 214 km acima sua foz durante o período da piracema.

A implantação de planos e ações de manejo eficientes precisam ser conduzidas tomando como base informações científicas (AGOSTINHO et al., 2007b; LOPES et al., 2007; PIORSKI et al., 2008;). Especialmente em situações que podem causar danos ao patrimônio genético da espécie, como no caso das ações de estocagem ou da instalação de mecanismos de transposição que podem funcionar como armadilhas ecológicas, é fundamental que compreendamos a estruturação entre as populações, suas rotas migratórias e diversidade genética. Para estes fins, os marcadores moleculares podem ser ferramentas de extrema utilidade (PIORSKI et al., 2008).

Neste contexto, os marcadores microssatélite (PIORSKI et al., 2008) e *D-loop* no DNA mitocondrial (MANCERA-RODRÍGUEZ, MARQUEZ e HURTADO-ALARCÓN, 2013) vêm sendo empregados em estudos populacionais de peixes e especialmente em *P. lineatus* (GARCEZ, CALCAGNOTTO e ALMEIDA-TOLEDO, 2011; RUEDA et al., 2013;). Os marcadores microssatélite (*Single Sequence Repeat – SSR*) estão entre os mais variáveis, com ampla gama de aplicações incluindo a genética de populações e conservação, possuem natureza codominante, e caracterizam-se por repetições em tandem de motivos de 1 a 6 nucleotídeos (CHISTIYAKOV, HELLEMANS e VOLCKAERT, 2006) e atualmente diferentes metodologias vem tornando possível realizar a genotipagem de maneira automática em sequenciador, e com um custo relativamente baixo (SCHUELKE, 2000), o que trouxe maior velocidade as análises.

O DNA mitocondrial evolui muito mais rápido do que genes cópia única nucleares, podendo chegar de cinco a dez vezes mais rápido (HARTL e CLARK,

2010). A região *D-loop* localiza-se na região controladora do DNA mitocondrial, e possui a maior taxa de evolução do DNA mitocondrial, em muitos táxons de animais (FREELAND, 2005) por este motivo é a mais utilizada em estudos populacionais (MANCERA-RODRÍGUEZ, MARQUEZ e HURTADO-ALARCÓN, 2013).

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo analisar, com base em marcadores microssatélite e mitocondriais (*D-loop*), a estrutura genética de populações de *P. lineatus* coletadas no rio Laranjinha e na represa de Capivara. Ainda, a partir dos resultados obtidos nestas análises inferir sobre a existência ou não de um fluxo gênico, o qual poderia indicar a utilização do rio estudado como rota alternativa de peixes oriundos do reservatório.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Espécie estudada

Prochilodus lineatus (Figura 2), pertence à ordem Characiformes e à família Prochilodontidae, está distribuída pelas bacias do Paraná-Paraguai e Paraíba do Sul, ocorrendo no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (CASTRO e VARI, 2003). Os membros desta família, possuem médio porte e hábito alimentar iliófago (FUGI, HAHN e AGOSTINHO, 1996). Peixes do gênero *Prochilodus* são considerados migradores de longa distância (AGOSTINHO et al., 2007), e exemplares de *P. lineatus* já se mostraram capazes de atravessar longos trechos de reservatório em busca de ambientes lóticos, onde desempenharam grande velocidade de migração, além de sua capacidade em localizar rotas alternativas (ANTÔNIO et al., 2007). Adicionalmente, já foram capturados dentro de escadas de transposição durante o período da piracema (MAKRAKIS et al., 2007), e nosso grupo capturou durante o verão de 2008/2009 um grande cardume dentro de uma escada de transposição localizada no rio Laranjinha.



Figura 2 - Exemplar de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1837) capturado no rio Laranjinha. Comprimento Padrão: 23,4 cm, número de registro: 3143 (Foto: do autor)

Em um estudo conduzido na represa de Capivara (rio Paranapanema) *P. lineatus* foi a que apresentou maior fecundidade, produzindo em média $1,28 \times 10^6$ ovócitos. Apresentando atividade reprodutiva incipiente durante a primavera e intensa durante o verão, possui uma desova única por temporada reprodutiva (ORSI, 2010)

Os membros da família Prochilodontidae são muito importantes tanto na pesca de subsistência como na pesca profissional (CASTRO e VARI, 2003), no último Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, publicado pelo Ministério da Pesca e Agricultura do Brasil, realizado em 2010 é possível observar um aumento da pesca extrativa continental que passou de 239.492,6t em 2009 para 248.911,4t em 2010, apresentando um aumento de 3,9%. Dentre os peixes de águas continentais, àqueles conhecidos popularmente como “Curimatãs”, onde inserem-se peixes do gênero *Prochilodus* spp. foram os com maior captura 28.432t representando mais de 11% do pescado extraído em águas continentais (BRASIL, 2012).

2.2 Área de estudo

Foram amostrados ao todo 60 indivíduos, 30 provenientes da represa de Capivara (Figura 3 e Tabela 1), coletados entre março e abril de 2010, e 30 oriundos do rio Laranjinha (Figura 3 e Tabela 1), capturados entre fevereiro e dezembro de 2011. Para as coletas foram utilizadas redes de espera, redes de arrasto e tarrafas (Autorização nº 23315-1 MMA/ICMBio/SISBIO). Em campo, os indivíduos foram acondicionados

em gelo e trazidos para o Laboratório de Genética e Conservação da UENP ou para o Laboratório de Genética Animal da UEL, onde foram triados e tiveram amostras de musculatura e/ou nadadeira preservada em etanol 95% à -20°C. Alguns exemplares foram fixados em formol 10%, e armazenados em etanol 70% na Coleção Ictiológica da UENP ou no Museu de Zoologia da UEL.

Tabela 1 – Localização dos trechos de coleta no rio Laranjinha e represa de Capivara.

Trecho de Coleta	N	Coordenadas Geográficas
Capivara	30	22°47'44.11"S / 50°59'19.44"O
Laranjinha	30	
<i>Barragem</i>	24	23°24'53.06"S / 50°27'8.60"O
<i>Santa Amélia</i>	2	23°17'49.95"S / 50°28'43.27"O
<i>Foz</i>	4	23° 1'53.90"S / 50°26'51.90"O
TOTAL	60	

p

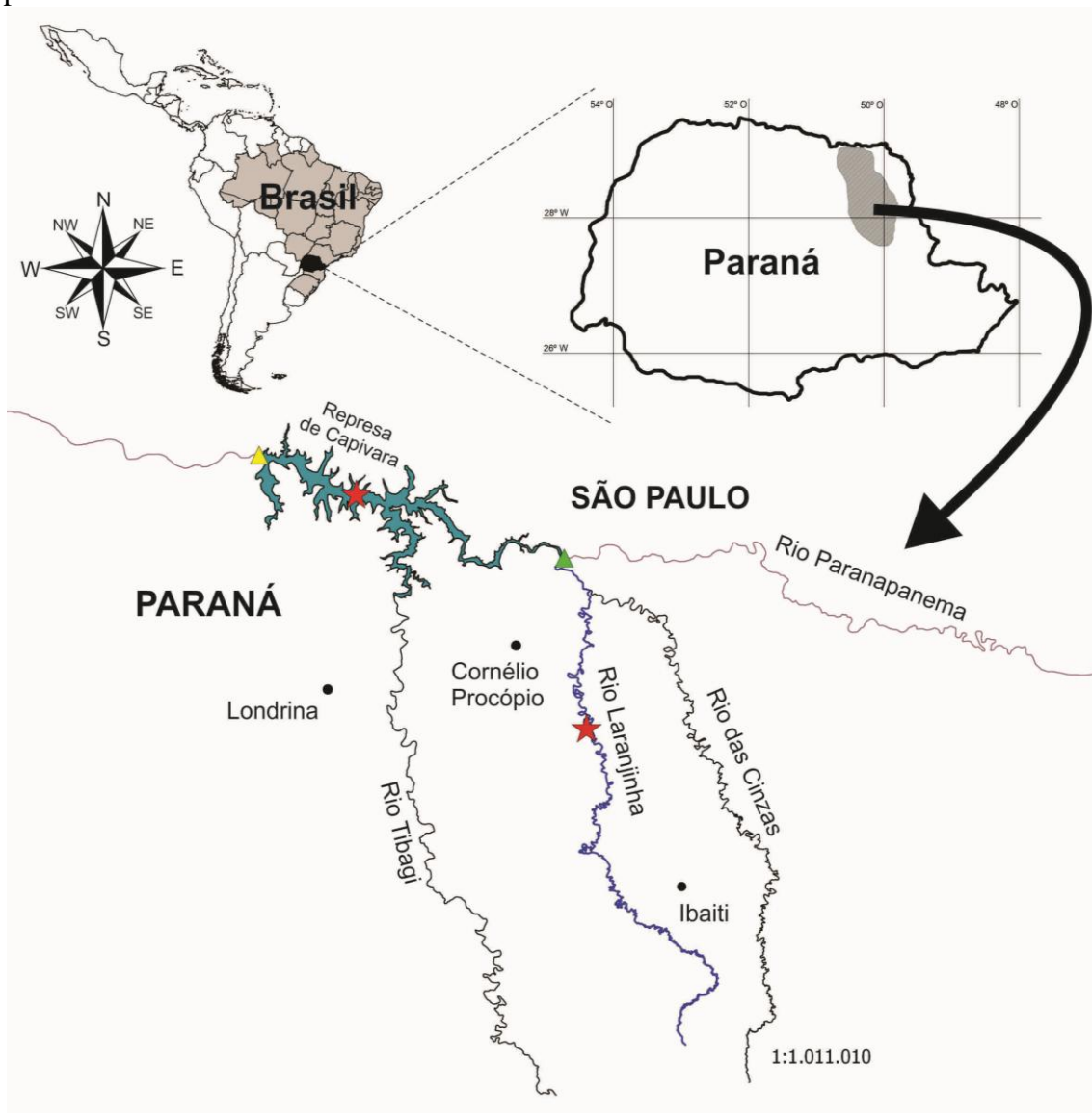


Figura 3 – Mapa dos pontos de coleta. Estrelas vermelhas representam locais de coleta. Triângulo amarelo representa UHE Capivara e triângulo verde a UHE Canoas I.

O DNA foi extraído por meio de uma metodologia baseada em lavagens com fenol/clorofórmio e centrifugações (ALMEIDA, FUNGARO e SODRÉ, 2001) de amostras fixadas em etanol de nadadeira raiada ou músculo. Em seguida foi quantificado em fluorímetro Qubit (Invitrogen) com o kit comercial QUANT-IT DSDNA BR (Invitrogen) e diluídas à uma concentração padrão de 5 ng/ μ L.

2.3 Análise de microssatélites

Para as análises de microssatélites foram utilizados *primers* obtidos em dois conjuntos descritos para a espécie por Rueda et al. (2011) e por Yazbeck e Kalapothakis (2007). Dos *primers* disponíveis nestas publicações, todos foram testados e 11 foram selecionados para as análises: PL 03, PL 09, PL 34, PL 64, PL 119, PL 139, Pli 30, Pli 34, Pli 43, Pli 60 e Pli 61.

Para realizar a genotipagem automatizada em sequenciador, os produtos de PCR foram marcados segundo um procedimento proposto por Schuelke (2000), neste procedimento utilizam-se três *primers* na reação: o *primer* F de cada par que recebe uma sequência M13(-21) de 18 nucleotídeos (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') na região 5', o *primer* R normal sem nenhuma modificação e um terceiro *primer* que é apenas a sequência M13 marcada com um fluoróforo (FAM, NED ou HEX). As condições nas quais foram realizadas as reações de PCR estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições utilizadas na reação de PCR dos marcadores microssatélites, modificado segundo protocolo para marcação dos produtos de PCR de Schuelke (2000). Utilizando o Kit comercial Go Taq® Green Master Mix (Promega, Wisconsin, USA).

Concentração dos componentes da reação		Configuração dos ciclos de temperatura		
Componente	Conc. final	Temperatura	Tempo	Nº de repetições
Master Mix	1x	94°C	5 min	1 vez
Primer F+M13	0,0125 µM	94°C	30 seg	
Primer R	0,125 µM	Variável*	1 min	10 Ciclos
Primer M13 - Marcado	0,125 µM	72°C	1 min	
Glicerol	1%	89°C	30 seg	
Água “nuclease free”	q.s.p.	Variável*	1 min	25 Ciclos
DNA molde	5ng	72°C	1 min	
Volume final	5µl	72°C	30 min	1 vez

* Temperatura de anelamento otimizada para os primers: : PL 03 (50°C), PL 09 (55°C), PL 34 (56°C), PL 64 (62°C), PL 119 (58°C), PL 139 (53°C), Pli 30 (54°C), Pli 34 (60°C), Pli 43 (54°C), Pli 60 (54°C) e Pli 61 (60°C)

Os 11 locos amplificados foram agrupados em conjuntos de três ou dois, contendo um loco marcado com cada fluorescência (FAM, HEX e NED); nas genotipagens foram utilizados 2 µL produto de PCR de cada loco, e completado o volume com água “nuclease free” para 15 µL. Em cada poço da placa de sequenciamento foram adicionados 2 µL deste produto de PCR marcado e diluído, 8µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, CA), 0,1 µL do marcador de peso molecular GeneScan LIZ 600 (Applied Biosystems, CA). Estas placas foram colocados em sequenciador automático (Genetic Analyzer – modelo: 3500XL/Applied

Biosystems) para genotipagem. Os picogramas gerados foram analisados manualmente pelo programa GeneMarker v.1.85.

Para as análises de diversidade genética foram estimados ou calculados alguns parâmetros, dentre eles: proporção de locos polimórficos (\bar{P}), o número de alelos (N_a), número de alelos efetivos (N_e), Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e), Diversidade Genética de Nei (1973) (H_s) pelo programa POPGENE v. 1.32 (YEH et al., 2000); a riqueza alélica foi estimada pelo software FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET, 2002), o programa GenAlEx v. 6.4 (PEAKALL e SMOUSE, 2006) foi utilizado para estimativa de alelos privados (N_p), alelos com frequência superior a 5% ($N_{f>5\%}$). O Equilíbrio de Hardy-Weinberg por locus e por população, e o desequilíbrio de ligação para cada par de loci em cada população foi calculado pelo programa GENEPOP v. 1.2 (RAYMOND e ROUSSET, 1995) e os valores de significância (valor de P) foram ajustados pela correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989). Os erros de genotipagem devido a presença de alelos nulos, alelos *dropout* e picos *stutter* foram checados pelo programa MICRO-CHECKER v. 2.2.1 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). O programa BOTTLENECK v. 1.2.02 (CORNUET e LUIKART, 1996) foi utilizado para verificar evidências de possíveis reduções recentes no tamanho populacional das amostras, para tanto foram utilizados os diferentes modelos de evolução para microssatélites *Infinite alleles Model* (IAM), *Stepwise Mutation Model* (SMM) e *Two-Phase Model* (TPM) este último considerando 90% SMM e 10% IAM, o nível de significância foi avaliado pelo teste de Wilcoxon considerando $P < 0,05$.

O programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (EXCOFFIER et al., 2010) foi empregado na análise da variância molecular (AMOVA), utilizada para estimar os componentes da variação genética dentro e entre as amostras, para calcular a estruturação genética entre as amostras por meio do índice F_{ST} (WEIR e COCKERHAM, 1984), que leva em consideração o modelo IAM, e também pelo índice R_{ST} (SLATKIN, 1995) que assumi o modelo SMM, nestas situações o teste de significância foi realizado a partir de 10.000 permutações.

Uma estimativa bayesiana de fluxo gênico foi realizada pelo programa BAYESASS 1.3 (WILSON e RANNALA, 2003).

O programa STRUCTURE v.2.3.3 (PRITCHARD, STEPHENS, e DONNELLY, 2000) foi utilizado para verificar a relação das amostras a partir de agrupamentos bayesianos. O modelo *admixture* que assume que os indivíduos podem ter ancestralidade mista possuindo contribuições genóticas de diferentes populações (PRITCHARD, STEPHENS, e DONNELLY, 2000) foi utilizado na análise. As estimativas do número de populações (K) foram realizados em simulações de 1 a 5 (número de amostras + três), reproduzindo 20 corridas para cada valor de K segundo Evanno, Ragnaut e Goudet (2005), com 10.000 interações no *burn-in* e 100.000 interações na Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). As ordenações dos resultados e inferência do K mais provável estatisticamente, utilizando a estatística ΔK (EVANNO, REGNAUT e GOUDET et al., 2005) foram realizadas pelo aplicativo STRUCTURE HARVESTER 0.6.93 (EARL, 2012)

2.4 Análise do D-loop

Para análise do genoma mitocondrial a região *D-loop* foi parcialmente amplificada de acordo com Panarari-Antunes et al (2008) utilizando os *primers* L 5'-AGAGCGTCGGTCTTGTAACCC-3' (CRONIN et al., 1993) e H 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (MEYER et al., 1990). As reações de PCR utilizadas na amplificação deste fragmento estão resumidas na tabela 3

Tabela 3 - Condições utilizadas na reação de PCR da região *D-loop* do genoma mitocondrial, utilizando o Kit comercial Go Taq® Green Master Mix (Promega).

Concentração dos componentes da reação		Configuração dos ciclos de temperatura		
Componente	Conc. Final	Temperatura	Tempo	Nº de repetições
Master Mix	1x	94°C	4 min	1 vez
Primer H	0,5µM	94°C	30 seg	
Primer L	0,5µM	55°C	30 seg	40 ciclos
Água “ <i>nuclease free</i> ”	q.s.p	72°C	2 min	
DNA molde	15	72°C	10 min	1 vez
Volume final	25µL	4°C	∞	

O produto desta primeira reação de PCR foi purificado utilizando-se a enzima Illustra™ ExoStar 1-Step (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, este produto de PCR, já purificado, foi utilizado como molde nas reações de sequenciamento, nestas reações cada filamento do DNA foi amplificado

separadamente utilizando o kit BigDye Terminator™ kit (v.3.1–Applied Biosystems), 0,5µM de *primer*, 1µL do produto de PCR previamente purificado e seguindo as demais orientações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram levadas ao seqüenciador automatizado Genetic Analyzer – modelo: 3500XL (Applied Biosystems).

O aplicativo *Electropherogram Quality Analysis* (TOGAWA; BRIGIDO, 2003), acessado em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> foi utilizado para a análise de qualidade das sequências e geração dos *contigs*, estes foram alinhados no programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999) por meio do aplicativo Clustal W (THOMPSON, 1994), depois de alinhados, todas as mutações foram checadas manualmente por meio do software DNA Baser v. 3.5.5.216 (Heracle BioSoft SRL). Na página do NCBI – *National Center for Biotechnology Information*, acessada em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, as sequências foram submetidas à uma busca no aplicativo BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1990) para confirmação de sequenciamento da região de interesse, as sequências também foram submetidas à uma busca no programa on-line tRNAscan-SE (LOWE; EDDY, 1997) disponível no sítio: <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/> para checar a existência de RNA transportador.

Os cálculos do número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (Pi), a determinação dos haplótipos, frequência haplotípica, partição da diversidade genética pelo cálculo da AMOVA, estruturação populacional pelo Fst par a par, os testes de neutralidade seletiva de Tagima (D) e Fu (Fs) foram calculados pelo programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (EXCOFFIER et al., 2010).

A rede de haplótipos baseada no algoritmo *median-joining* (BANDELT et al., 1999), foi gerada no programa Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd - <http://www.fluxus-engineering.com>)

O programa MEGA 5.2 (TAMURA et al., 2011) foi utilizado para se estimar a distância genética dentro e entre as linhagens. O mesmo software foi empregado na escolha do modelo de evolução nucleotídica mais provável considerando o menor escore para Critério de Informação Bayesiana (BIC), seguido pelo maior escore de Critério de Informação de Akaike Corrigido (AICc).

3 RESULTADOS

3.1 Diversidade Genética

Microsatélites

Os 11 locos utilizados foram polimórficos nas duas amostras, produzindo um total de 179 alelos para o conjunto das amostras. O número de alelos identificados por loco variou de dois (loco PL09) a 38 (PL119), com uma média de 16,27 alelos por loco. Para a amostra do rio Laranjinha foram identificados 112 alelos, sendo 26 destes alelos privados. Um número maior de alelos foi detectado na amostra do reservatório de Capivara, a qual apresentou 153 alelos, dos quais, 67 foram privados (Tabela 4). Em relação ao número de alelos com frequência superior a 5%, estes corresponderam a 58 alelos na amostra do rio Laranjinha e 68 na do reservatório de Capivara. A heterozigosidade observada (H_o) global, considerando as amostras das duas localidades em conjunto, foi de 0,577, enquanto que a esperada (H_e) foi de 0,692. Os valores de H_o e H_e da amostra da represa de Capivara foram um pouco superiores ao do rio Laranjinha (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros genéticos estimados para as amostras de *Prochilodus lineatus* do rio Laranjinha e represa de Capivara, bacia do Paranapanema, Brasil, analisadas por meio dos marcadores de microssatélites. N – número de indivíduos, Na – número de alelos, Ne – número de alelos efetivos, Np – número de alelos privados, N_{af >5%} – número de alelos com frequência acima de 5%, R_A – riqueza alélica, Ho – heterozigotidade observada, He – heterozigotidade esperada, F_{IS} – índice de endogamia (*P < 0,05), EHW – teste de significância para possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor de P < 0,05 após a correção sequencial de Bonferroni considerando $\alpha=0,05$). A_{Nul} – presença de alelos nulos.

Rio Laranjinha											
Loco	N	N _a	N _e	N _p	N _{af>5%}	R _A	Ho	He	F _{IS}	EHW	A _{Nul}
PL 03	30	4	1,756	1	3	3,90	0,300	0,438	0,319*	0,004*	Sim
PL 09	30	2	1,142	0	2	2,00	0,133	0,127	-0,055	1,000	Não
PL 34	30	7	1,594	4	3	6,60	0,133	0,379	0,652*	0,000*	Sim
PL 64	30	11	7,347	2	7	10,69	0,933	0,878	-0,064	0,170	Não
PL 119	29	22	14,754	5	9	21,43	0,965	0,949	-0,018	0,096	Não
PL 139	29	13	8,286	3	7	12,85	0,448	0,895	0,503*	0,000*	Sim
Pli 30	27	16	8,945	5	8	16,00	0,852	0,905	0,060	0,160	Não
Pli 34	30	7	1,773	2	3	6,60	0,167	0,443	0,628*	0,000*	Sim
Pli 43	30	17	9,278	2	7	16,27	0,967	0,907	-0,067	0,410	Não
Pli 60	30	10	3,516	2	6	9,69	0,333	0,728	0,546*	0,000*	Sim
Pli 61	30	3	2,074	0	3	3,00	0,700	0,527	-0,337	0,108	Não
Total		10,182	5,497	28	58	9,91	0,539	0,652	0,159*		
Represa de Capivara											
Loco	N	N _a	N _e	N _p	N _{af>5%}	R _A	Ho	He	F _{IS}	EHW	A _{Nul}
PL 03	30	5	2,521	2	4	4,90	0,567	0,614	0,078	0,010	Não
PL 09	30	2	1,069	0	1	1,99	0,067	0,065	-0,018	1,000	Não
PL 34	30	7	2,156	4	4	6,70	0,367	0,545	0,331*	0,003*	Sim
PL 64	30	15	9,184	6	8	14,53	0,900	0,906	0,007	0,473	Não
PL 119	29	33	23,361	16	8	31,54	0,897	0,974	0,081*	0,007*	Não
PL 139	30	21	14,062	11	11	20,36	0,700	0,945	0,262*	0,000*	Sim
Pli 30	30	23	13,433	12	10	22,06	0,933	0,941	0,009	0,981	Não
Pli 34	30	8	2,323	3	4	7,69	0,333	0,579	0,429*	0,000*	Sim
Pli 43	30	22	11,613	7	10	20,98	0,933	0,929	-0,004	0,666	Não
Pli 60	30	13	4,215	5	5	12,75	0,400	0,776	0,489*	0,000*	Sim
Pli 61	30	4	2,553	1	3	3,99	0,667	0,619	-0,079	0,649	Não
Total		13,909	7,863	67	68	13,41	0,615	0,718	0,142*		

As duas amostras estudadas, apresentaram um coeficiente de endogamia (F_{IS}) geral significativo (Tabelas 4 e 5), tanto no rio Laranjinha como na represa de Capivara cinco locos apresentaram coeficientes de endogamia significativos (Tabelas 4 e 5). Nas duas localidades, os mesmos locos que apresentaram o coeficientes de endogamia significativo também mantiveram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção sequencial de Bonferroni, estes mesmos locos apresentaram evidências da ocorrência de alelos nulos, com exceção do locos PL 119 na represa de Capivara.

Tabela 5 – Parâmetros de diversidade genética para *Prochilodus lineatus* coletados no rio Laranjinha e represa de Capivara, estimados por meio dos marcadores microsatélite e *D-loop*, considerando a amostra total. N – número de indivíduos analisados, \bar{P} – Proporção de locos polimórficos, A – número total de alelos encontrados na amostra, Np – número de alelos privados, $\bar{N}A$ – número médio de alelos por locos na amostra, $\bar{N}E$ – número médio de alelos efetivos por locos na amostra, H_O – Heterozigozidade observada média na amostra, H_e – Heterozigozidade esperada média na amostra, H_s – Heterozigozidade esperada de Nei (1973), F_{IS} – Índice de endogâmia dentro da população (* $P < 0,05$), RA – Riqueza Alélica, Nh – número de haplótipos encontrados, Nhe – número de haplótipos exclusivos, h – Diversidade haplotípica, π – Diversidade nucleotídica, D - teste de neutralidade de Tajima (1989), Fs – teste de neutralidade de Fu (1997). ^{NS} – Não Significativo.

	N	Rio Laranjinha	N	Represa de Capivara
Microsatélite	30		30	
\bar{P}		100%		100%
A		112		153
Np		26		67
$\bar{N}A$		10,182		13,909
$\bar{N}E$		5,497		7,863
H_O		0,539		0,615
H_e		0,652		0,718
H_s		0,641		0,706
F_{IS}		0,159*		0,142*
RA		9,91		13,41
<i>D-loop</i>	30		30	
Nh		9		19
Nhe		5		15
h		0,7034 ±0,0854		0,9609 ±0,0182
π		0,0135 ±0,0072		0,0182 ±0,0095
D		-0,5530 ^{NS}		-0,9933 ^{NS}
Fs		2,8342 ^{NS}		-3,1587 ^{NS}

Após a correção sequencial de Bonferroni, dois pares de *primers* apresentaram-se em desequilíbrio de ligação no rio Laranjinha (PL 64 x Pli 30, PL 139 x Pli 30), e

dois pares na represa de Capivara (PL 34 x Pli 34 e PL 139 x Pli 43), o que representa 3,64% das combinações de pares de *primers* possíveis dentro de cada amostra.

O teste para excesso de heterozigidade foi significativo para dois modelos evolutivos diferentes (TPM e SMM), tanto para o rio Laranjinha, como para a represa de Capivara, e indicou a ocorrência de possíveis reduções recentes no tamanho populacional nestas localidades (Tabela 6).

Tabela 6 - Teste de sinal para excesso de heterozigidade para os 11 locos de microssatélites duas amostras de *Prochilodus lineatus*. IAM – Modelo de Alelos Infinitos (*Infinite Allele Model*), TPM – Modelo Bifásico (90% SMM) (*Two Phase Model*), SMM – Modelo Passo a Passo (*Stepwise Mutation Model*). * $P \leq 0,05$ indicando excesso de heterozigidade.

Trecho amostral	IAM	TPM	SMM
Rio Laranjinha	0,6377	0,0210*	0,0122*
Represa de Capivara	1,000	0,0093*	0,0024*

D-loop

A região *D-loop* foi amplificada, e um fragmento de 539pb foi sequenciado. Destes 70 pertencem ao RNA transportador da prolina. O sequenciamento parcial da porção hipervariável da região *D-loop* foi confirmado pela análise de BLAST (NCBI) com 99% de homologia à outras sequências depositadas para a mesma espécie (Ex: Genbank: - AF282748.1). A análise dos indivíduos provenientes das duas localidades identificou 58 sítios variáveis, para os quais foram observadas 59 substituições; destas, 56 originadas de transições e três de transversões (Figura 4). A composição de bases foi de 12,54% de C, 36,24% de T, 30,95% de A e 20,27% de G. Estes sítios variáveis formam 24 haplótipos diferentes; destes, nove são encontrados no rio Laranjinha e outros 19 na represa de Capivara. A população do rio Laranjinha apresentou cinco haplótipos exclusivos e a represa Capivara 15, outros quatro haplótipos (Hap_02, Hap_04, Hap_06 e Hap_07) foram compartilhados entre as duas localidades. Os haplótipos exclusivos de cada localidade, quase sempre estavam presentes em apenas um único indivíduo (Tabela 7). Considerando as duas amostras em conjunto, foram observadas diversidades haplotípica (h) e nucleotídicas (π) iguais a 0,879 ($\pm 0,0335$) e 0,0167 ($\pm 0,0086$), respectivamente. Entretanto, quando analisadas separadamente, foi

O modelo de evolução nucleotídica mais provável apontado pelo programa MEGA 5.2 foi Tamura 3 Parâmetros.

Usando-se os critérios de frequência e posição na rede de haplótipos (FREELAND, 2005), não foi possível identificar um haplótipo ancestral nas amostras analisadas. Também, não existiram linhagens mitocondriais exclusivas para o rio ou para a represa. Ainda, é possível se observar que a maioria dos haplótipos estão separados por um grande número de passos mutacionais e que a maioria dos haplótipos intermediários estão ausentes (Figura 5). A distância máxima entre dois haplótipos foi de 4,5%, entre os haplótipos Hap_15 e Hap_21, e o número de passos mutacionais pode chegar a 27, entre os haplótipos H6 e H8.

Os testes de neutralidade seletiva de Tajima (D) e Fu (Fs) não foram significativos nem para as amostras em separado, nem para o conjunto amostral.

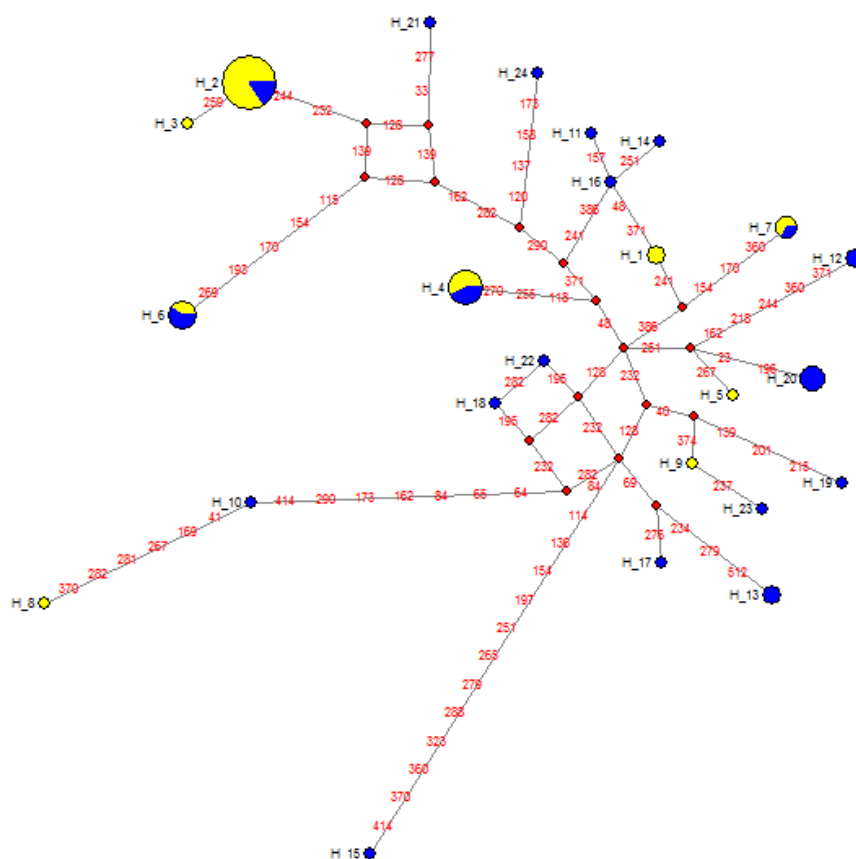


Figura 5 – Rede de haplótipos da região *D-loop* para *Prochilodus lineatus* coletados no rio Laranjinha e represa de Capivara, baseada no algoritmo median-joining (BANDEL et al., 1999). Os círculos representam os haplótipos e são proporcionais às frequências dos mesmos, a cor amarela representa o rio Laranjinha e azul a represa de capivara. Os Números representam a localização dos pontos mutacionais na sequência.

3.2 Estrutura Genética

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou para os dados de microssatélite (F_{ST} e R_{ST}), que uma pequena parcela da diversidade genética está distribuída entre as amostras, e que a maioria está presente dentro destas. De forma similar, esta análise aplicada aos marcadores mitocondriais (Φ_{ST}) também revelou que a maior parcela da diversidade encontra-se presente dentro das populações; entretanto, neste caso, foi possível observar uma parcela maior da diversidade distribuída entre as populações, superior àquela revelada pelos marcadores nucleares (Tabela 8). Enquanto, o valor de F_{ST} se mostrou significativo, valor estimado de R_{ST} não diferiu significativamente de zero. A análise de distância e identidade de Nei (1978) entre as duas amostras foram respectivamente 0,0614 e 0,9404. O estimador Φ_{ST} , obtidos com base nos marcadores mitocondriais, também se mostrou significativamente diferente de zero (Tabela 8).

Tabela 8 - AMOVA (Análise da Variância Molecular) para as amostras de *Prochilodus lineatus* coletados no rio Laranjinha e represa de Capivara, para os marcadores microssatélites e mitocondriais (*D-loop*). * $P \leq 0,01$ (teste de significância com 1023 permutações).

Fonte de Variação	Porcentagem de variação		
	Microssatélite		<i>D-loop</i>
	F_{ST}	R_{ST}	Φ_{ST}
Entre populações	2,04	1,49	8,93
Dentro de populações	97,96	98,51	91,07
Índice de fixação	0,0204*	0,0149	0,0893*

Por meio da inferência bayesiana foi detectado a existência de uma quantidade significativa de fluxo gênico, de um modo geral a taxa de migração entre as duas localidades é de 0,166 (IC 95%: 0,00787 – 0,325). A ocorrência de migração pode ser detectada em ambas as direções, tanto do rio Laranjinha em direção à represa de Capivara, como na direção oposta (Tabela 9). A presença de haplótipos compartilhados entre o rio Laranjinha e a represa de Capivara, é outra evidência da existência de fluxo gênico entre estas duas localidades (Tabela 7).

Tabela 9 – Inferência de fluxo gênico bayesiana utilizando o programa BeysAss. Porcentagem de migrantes e de não migrantes dentro de cada uma das duas localidades estudadas (rio Laranjinha e represa de Capivara) para a espécie *Prochilodus lineatus*. Entre parênteses intervalo de confiança (IC).

Amostra	Constituição da diversidade genética	
	Proporção de indivíduos não migrantes (95% IC)	Proporção de indivíduos migrantes (95% IC)
Rio Laranjinha	0,7180 (0,6797 – 0,7688)	0,2820 (0,2312 – 0,3203)
Represa de Capivara	0,8270 (0,7323 – 0,9169)	0,1730 (0,0831 – 0,2677)

A análise de agrupamentos bayesianos, apontou um K (número de agrupamentos) mais provável, calculado a partir do delta K (ΔK) dos valores de $\ln(PD)$ igual a três. O gráfico construído mostra nitidamente a ocorrência de indivíduos migrantes em ambas as direções. Esta análise também aponta que o rio Laranjinha possui indivíduos predominantemente de uma única “amostra ou *pool* gênico”, enquanto que a represa de Capivara pode ter sido originada de pelo menos duas “amostras ou *pools* gênicos” (Figura 6).

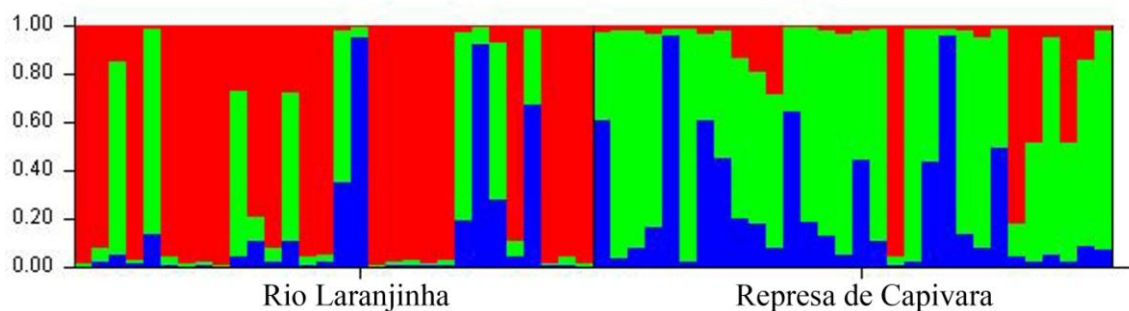


Figura 6 – Representação gráfica dos agrupamentos bayesianos ($K=3$), gerados a partir de 11 locos de microssatélites para as amostras de *Prochilodus lineatus* coletadas no rio Laranjinha e na represa de Capivara.

4 DISCUSSÃO

4.1 Diversidade Genética

Altos níveis de diversidade genética são comumente encontrados em espécies migradoras, as quais geralmente apresentam grandes populações panmíticas e altas taxas de migração, aspectos estes que atuam contrabalanceando os efeitos da deriva genética, que agem diminuindo a diversidade genética intra linhagem (SANTOS, RUFFINO e FARIAS, 2007). *Prochilodus lineatus* é um migrador de longas distâncias e, frequentemente, apresenta altos índices de diversidade genética revelados por diferentes tipos de marcadores moleculares, incluindo marcadores isoenzimáticos (REVALDAVES, RENESTO e MACHADO, 1997), marcadores de caráter dominante, como RAPD (PAULA, 2006), microsatélites (PAULA, 2006; RUEDA et al., 2013) ou de DNA mitocondrial (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001; GARCEZ, CALCAGNOTTO e ALMEIDA-TOLEDO, 2011).

No presente estudo, os níveis de diversidade genética encontrados tanto para os marcadores microsatélite, quanto para o *D-loop* foram compatíveis à outros trabalhos com a mesma espécie, e podem ser considerados altos.

Microsatélite

Os valores de diversidade genética para marcadores microsatélites (SSR), para as amostras tanto do rio Laranjinha como da represa de Capivara foram superiores a média encontrada, com estes mesmos marcadores, para espécies de água doce, que foi de 0,54 (\pm 0,25), (DEWOODY e AVISE, 2000). Rueda et al. (2013) utilizando os marcadores SSR para avaliar a diversidade genética de populações de *P. lineatus* do sistema do baixo rio Paraná, encontraram valores de H_o e H_e , respectivamente, de 0,63 e 0,71, e um número de alelos (N_A) variando de 131 a 141). Valores semelhantes àqueles encontrados em nosso trabalho, sendo apenas ligeiramente superiores aos encontrados para a amostra do rio Laranjinha. Por outro lado, o número de alelos observados para a amostra da represa de Capivara mostrou-se superior àqueles encontrados por estes autores. Os valores médios de H_e e número de alelos por loco da população do rio Laranjinha e represa de Capivara ficam acima também do valor médio

encontrado para *P. lineatus* oriundos de três localidades do médio rio Paraná (RUEDA et al., 2011). O número médio de alelos, considerando nossas duas localidades, foi superior também ao encontrado para *P. lineatus* da bacia do rio Grande (YAZBECK e KALAPOTHAKIS, 2006).

Os locos que se apresentaram fora do EHW devido ao excesso de homozigotos, também apresentaram um coeficiente de endogamia significativo, isto pode ser reflexo de programas de cultivo pequeno número de progenitores utilizado para formação de alevinos que foram soltos sistematicamente nas duas últimas décadas na represa de Capivara e seus afluentes, tais como o rio Laranjinha (comunicação pessoal SEAB).

Yazbeck e Kalapothakis (2007), estudando *P. lineatus* na bacia do rio Grande, encontram uma situação muito semelhante para dois locos que apresentam os maiores déficits de heterozigotos, os maiores coeficientes de endogamia e conseqüentemente desvios do EHW. Neste caso, os autores sugeriram três possibilidades, incluindo entre estas a presença de alelos nulos, o efeito de Wahlund, e também a possibilidade de endogamia gerada pelo pequeno número de reprodutores utilizados na produção de uma grande quantidade de alevinos utilizados em programas de estocagem, apesar de não poderem comprovar isto sem estudos adicionais,

D-loop

A região *D-loop* é sabidamente a que possui as maiores taxas de mutações do genoma mitocondrial na maioria dos vertebrados, e especialmente em peixes vem apresentando taxas muito elevadas de evolução (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001; SANTOS, RUFFINO e FARIAS, 2007).

Em nosso trabalho, encontramos altos índices de diversidade genética no genoma mitocondrial de *Prochilodus lineatus* oriundos da represa de Capivara e do rio Laranjinha. Estes altos níveis de diversidade genética da região controle do DNA mitocondrial já foram reportados para *P. lineatus* coletados na bacia do rio Paraná (26 haplótipos únicos com divergência entre 0,3% e 3,6%) (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001) e na bacia do rio Grande (46 haplótipos, $h=0,7721$, $\pi=1,6\%$) (GARCEZ, CALCAGNOTTO e ALMEIDA-TOLETO, 2011). Os altos

valores de diversidade genética podem ser atribuídos ao grande tamanho populacional observado em toda sua área de ocorrência (SIVASUNDAR, BERMINGHAM, ORTÍ e 2001).

Observando a rede de haplótipos e os grandes valores de diversidade nucleotídica podemos perceber que em nossas áreas amostrais existem haplótipos muito divergentes ocorrendo em simpatria.

Segundo os parâmetros propostos por Grant e Bowen (1998) altos valores de diversidade haplotípica (acima de 0,5) e nucleotídica (acima de 0,5%) podem indicar zonas de contato secundário entre linhagens diferentes ou populações grandes e estáveis e com longa história de vida. Devido à grande distância entre alguns haplótipos, e as inexistências de haplótipos intermediários e um haplótipo ancestral, acreditamos que a hipótese de contato secundário seja mais plausível. No entanto é impossível discriminar se este contato secundário é oriundo de equívocos na condução de estocagens, ou naturalmente devido à grande capacidade migratória da espécie.

Situação semelhante também foi encontrada por Sivasundar, Bermingham e Ortí (2001) para *P. lineatus* em regiões do baixo rio Paraná onde também foram encontrados em simpatria haplótipos geneticamente distantes. Por outro lado, os mesmos autores também encontraram haplótipos de *D-loop* proximamente relacionados em localidades tão distantes quanto Alto e Baixo Paraná. Ainda que seja impossível explicar se este padrão filogeográfico é consequência de um fluxo gênico histórico através das quedas de Guaíra que separava o alto e baixo Paraná, ou por consequência do mecanismo de transposição construído recentemente na hidrelétrica de Itaipú. A grande capacidade migratória de *Prochilodus* pode explicar as duas situações ilustradas acima (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001)

4.2 Estruturação genética

Para evitar a perda de diversidade e estrutura genética, seja por soltura deliberada ou acidental Padhi (2013) alerta para o fato de que a soltura ou mesmo criação de peixes em cativeiro deveria obedecer estudos prévios da estrutura e diversidade genética, impedindo assim a mistura de estoques oriundos de linhagens

diferentes. Entretanto, no Brasil, em especial na bacia do rio Paraná e Paranapanema, a maioria dos programas de soltura não toma por base estudos prévios da estrutura genética das populações selvagens e de cativeiro, quando se utiliza alguma ferramenta genética, quase sempre o único objetivo é a medida de diversidade genética por meio da proporção de loci polimórficos ou heterzigosidade.

Animais com maior longevidade, que exibem padrões migratórios sazonais podem muitas vezes pertencer a diferentes estoques que se sobrepõem espacialmente em parte do ano, podendo causar discrepâncias na estrutura populacional ao longo do tempo, como é o caso dos estoques “heterogêneos” de peixes nos quais as populações são formadas por uma variedade de grupos de tamanhos, origem geográfica ou estoques genéticos diferentes (RUEDA et al., 2013).

Apesar do valor de F_{ST} , apresentar uma estruturação genética pequena entre a amostra do rio Laranjinha e da represa de Capivara, segundo parâmetros propostos por Wright (1978), quando se considera o estimador R_{ST} não houve estruturação genética significativa entre estas localidades ($P > 0,05$). Em um trabalho com *Salminus brasiliensis*, uma outra espécie de caraciforme migrador, realizado no complexo Canoas (rio Paranapanema), ao encontrar F_{ST} que indicava igualmente uma pequena estruturação também as considerou formando um único grupo (LOPES et al., 2007). Desta maneira, consideraremos aqui também que as amostras do rio Laranjinha e da represa de Capivara poderiam constituir uma única população.

Por outro lado, *P. argenteus* coletados em duas localidades do rio São Francisco exibem uma estruturação muito baixa ($F_{ST}=0,008$) entretanto significativa, esta leve diferenciação genética é atribuída à existência de diferentes *pools* gênicos na localidade. (HATANAKA; HENRIQUE-SILVA e GALETTI, 2006), o mesmo é observado entre a represa de Capivara e o rio Laranjinha, que apresentam uma estruturação significativa em alguns casos (F_{ST}), porém baixa, o que é corroborado pela análise de agrupamentos bayesiana ($K=3$), que evidencia que esta estruturação é decorrente da existência de uma mistura de diferentes estoques genéticos nas amostras estudadas.

O maior índice de estruturação observada para o DNA mitocondrial em comparação ao DNA nuclear, pode ser explicado pela grande proporção de haplótipos exclusivos e raros observados nas duas localidades, com destaque para a represa de

Capivara, que pode distorcer alguns índices de diversidade e estrutura genética, tais como, a diversidade haplotípica (FREELAND, 2005) e o índice de estruturação Φ_{ST} (HOLLANDA CARVALHO, 2011).

Conforme apontado por Hollanda Carvalho (2011), altos índices de divergência podem indicar uma forte estruturação populacional, entretanto tais valores podem refletir a existência de um elevado número de haplótipos exclusivos.

Mesmo em áreas em que não há estruturação entre as populações, podem ser encontrados haplótipos exclusivos, as amostras de *P. lineatus* capturados no rio Grande (local de alimentação) e rio Mogi-guaçu (local de reprodução) não evidenciaram diferença significativa entre os sistemas destes dois rios, e apontou que a maior parte da variabilidade (*D-loop*) está dentro das populações (97,49%), no entanto as populações dentro destes rios apresentaram diferenças na composição haplotípica, dos 46 haplótipos encontrados entre as oito localidades, 35 eram exclusivos e 11 compartilhados, destes, apenas dois eram amplamente distribuídos, mesmo assim as populações não se estruturaram (GARCEZ; CALCAGNOTTO e ALMEIDA-TOLEDO, 2011).

Por outro lado, a existência de haplótipos compartilhados entre as amostras do rio Laranjinha e a represa de Capivara reforça a possibilidade de fluxo gênico entre as duas localidades.

As diferenças encontradas no DNA mitocondrial entre os indivíduos da represa de Capivara e do rio Laranjinha, os maiores níveis de diversidade genética da represa de Capivara, que também apresenta um maior número de alelos privados e haplótipos exclusivos, podem estar relacionados há algumas características biológicas de *P. lineatus*, como por exemplo, o comportamento de *hoaming*, que é aparentemente muito difundido no gênero *Prochilodus* (GODINHO e KYNARD, 2006), especialmente documentado na espécie *P. lineatus* (GODOY, 1959, 1975 *apud* GODINHO, KYNARD, 2006).

Este comportamento pode explicar porque apenas uma parcela dos haplótipos encontrados na represa de Capivara foram capturados no rio Laranjinha, mostrando que enquanto uma parte dos peixes da represa utiliza este rio durante alguma fase da sua vida, o restante dos indivíduos carregando haplótipos diferentes daqueles encontrados

no rio Laranjinha podem utilizar o rio das Cinzas, rio Tibagi, rio Congonhas ou rio Vermelho como rotas migratórias, ou ainda o próprio rio Laranjinha em outras épocas do ano, uma vez que pode haver uma divisão sazonal entre os estoques de *P. lineatus* (RUEDA et al, 2013).

Outro fator que pode gerar uma maior diversidade genérica na represa de Capivara, é a existência de diferentes estoques genéticos em um mesmo local, isto já havia sido documentado em *P. lineatus* no rio Uruguai, onde durante o inverno e primavera coexistiam dois estoques diferentes enquanto no outono três estoques distintos (RUEDA et al., 2013). Ainda considerando o mesmo gênero, *P. argenteus* coletados no rio São Francisco, exibem um grande número de alelos exclusivos e maior heterosigosidade em uma das localidades amostradas, e isto é atribuído pelos autores à existência de estoques genéticos distintos naquela localidade; os autores também inferem que estes diferentes grupos poderiam utilizar locais de reprodução diferentes (HATANAKA, HENRIQUE-SILVA e GALETTI JR, 2006). *Prochilodus marggravi* coletados na mesma localidade do rio São Francisco, também apresentam populações estruturadas e aparentemente diferentes estoques (HATANAKA e GALETTI, 2003).

A alta incidência de alelos privados de microssatélite e haplótipos exclusivos na represa de Capivara reforça a hipótese de que ela seja constituída por mais de um estoque genético uma vez que ela também possui um valor de heterozigosidade superior ao rio Laranjinha. O $K=3$ encontrado pela análise de agrupamentos bayesianos dos marcadores microssatélites corrobora com este cenário, pois a represa de Capivara é representada predominantemente por dois dos três grupos, enquanto que no rio Laranjinha há maior representatividade da amostra que é menos frequente em Capivara, isto reforça o que foi dito acima, que existem diferentes lotes de indivíduos na amostra total. Estes diferentes lotes, poderiam utilizar diferentes rotas e ou períodos para se reproduzirem, gerando uma diferenciação genética. Entretanto, pelo menos um destes estoques, ou pelo menos parte dele pode utilizar o rio Laranjinha como rota migratória, enquanto outras frações podem utilizar outros rios para isto.

Principalmente embasados nos dados de Rueda et al. (2013) devemos levar em consideração também o fato da diferença temporal entre as amostragens da represa de

Capivara e rio Laranjinha realizadas, respectivamente, durante os anos de 2010 e 2011. O que pode ser em parte responsável pelos valores de estruturação significativos.

Vale ressaltar que dos quatro haplótipos compartilhados entre rio Laranjinha e a represa de Capivara Hap_02, Hap_04 e Hap_06 estavam presentes em mais de dois indivíduos nas duas localidades, apenas Hap_07 que ocorreu em dois indivíduos no rio Laranjinha e apenas um exemplar da represa de Capivara. Enquanto que os haplótipos exclusivos quase sempre ocorrem em frequência muito baixa.

Apesar das características biológicas de *P. lineatus*, tais como, a alta capacidade de dispersão e o comportamento de *hoaming* explicarem bem a existência de diferentes *pools* gênicos para os marcadores de microssatélite, e até mesmo a existência de haplótipos mitocondriais tão divergentes (suficiente para caracterizar indivíduos oriundos de diferentes bacias), outros fatos chamam nossa atenção, tais como o número muito alto de alelos privados e haplótipos exclusivos, haplótipos intermediários ou ancestrais não serem encontrados e maioria destes haplótipos exclusivos estarem presentes em um único indivíduo. Estas particularidades, podem em parte, resultar de equívocos no manejo de reprodutores e proles utilizadas nos programas de estocagem na bacia do rio Paranapanema, que também pode ter ocasionado o alto nível de endogamia (F_{IS}) encontrado em nossa área de estudo.

Segundo informações da SEAB (Secretaria da Agricultura e Abastecimento) entre 2005 e 2011 foram soltos em toda bacia do Paranapanema 9.314.658 juvenis de *P. lineatus*, o que inclui a represa de Capivara, rio das Cinzas e Laranjinha. concessionárias do setor energético realizam procedimentos semelhantes desde o final do século passado. Apesar destes procedimentos no rio Paranapanema possuem em parte um acompanhamento da diversidade genética dos lotes de matrizes e alevinos, nunca houve um estudo da estrutura das populações, rotas migratórias antes da implementação desta ações e formação dos estoques de matrizes.

É importante se destacar em relação à preservação da diversidade genética que 16 dos 24 haplótipos estão presentes em apenas um indivíduo, ou seja, se considerarmos que metade destes indivíduos podem ser machos, oito destes haplótipos se perderiam nas próximas gerações, isto se as supostas oito fêmeas chegarem a se reproduzir, caso contrário a perda poderia ser ainda maior. Este exemplo demonstra como a deriva

genética pode agir de maneira muito intensa sobre o genoma mitocondrial, destacando a importância de se manter tamanhos populacionais grandes para que seus efeitos sejam menos intensos.

Entretanto, apesar da existência de uma pequena estruturação, provavelmente em decorrência da existência de mais de um estoque gênico neste sistema, e/ou de erros no manejo no processo de estocagem, é inquestionável, a ocorrência de migrações entre a represa de Capivara e rio Laranjinha de pelo menos parte do estoque.

Sabe-se que antes do início da estação chuvosa os indivíduos pertencentes ao gênero *Prochilodus* migram centenas de quilômetros dos locais de alimentação, tais como planície de inundação ou áreas mais baixas dos rios, para os locais de desova localizados nas cabeceiras dos rios. Os ovos fertilizados externamente no ambientes derivam rio abaixo até as planícies de inundação onde as larvas se alimentam (SIVASUNDAR, BERMINGHAM e ORTÍ, 2001).

Portanto, é imprescindível a localização de todos estes ambientes, locais de alimentação e locais de reprodução, no médio Paranapanema, para que esta espécie e tantas outras que possuam estratégias semelhantes possam completar seu ciclo de vida naturalmente.

Diversos autores vêm chamando atenção para a manutenção da integridade dos grandes tributários e remanescentes lóticos nas regiões onde existem reservatórios, devido à sua importância na preservação de espécies migradoras (PETRERE JR, 1996; HOFFMANN, ORSI e SHIBATTA, 2005; ORSI, 2010), acreditamos que no caso do baixo Paranapanema, onde localizam-se a represa de Capivara e o rio Laranjinha, a melhor estratégia de preservação da ictiofauna é a conservação dos seus afluentes que podem servir como rotas alternativas para grandes migradores.

5 CONCLUSÕES

1. As amostras de *Prochilodus lineatus* coletadas no rio Laranjinha e represa de Capivara apresentam níveis satisfatórios de diversidade genética, que podem à partir de comparações com dados da literatura serem considerados altos;
2. A amostra estudada é composta por mais de um *pool* gênico o que indica a existência de mais de um estoque de curimbas nesta região;
3. Há evidências contundentes da migração entre o rio Laranjinha e represa de Capivara, entretanto, esta não deve ser a única rota migratória de peixes oriundos de Capivara;
4. Alguns resultados obtidos podem ser decorrentes de equívocos no processo de estocagem realizados há pelo menos duas décadas na região, estes procedimentos precisam ser revistos, embasados em estudos de estrutura das populações e não apenas atentando-se à diversidade genética.
5. A bacia do rio das Cinzas, pela importância apontada acima não deveria nem ao menos ser considerada para futuros projetos para a instalação de PCHs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Eduem – Maringá, 501p.: 2007

AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; PETRY, A. C.; GOMES, L. C.; JÚLIO JR, H. F. Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health & Management**. v. 10(2), p.174–186: 2007

AGOSTINHO, A. A.; MARQUES, E. E.; AGOSTINHO, C. S.; ALMEIDA, D. A.; OLIVEIRA, R. J.; MELO, J. R. B. Fish ladder of Lajeado Dam: migrations on one-way routes? **Neotropical Ichthyology**, v.5 n. 2, p.121-130: 2007b

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. **Ecologia de Reservatório: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. Ed. Rima, São Carlos – SP, p. 23-55: 2005

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; LATINI, J. D. Fisheries management in Brazilian reservoirs: lessons from/for South America. **Interciencia-Caracas**-, v. 29, n. 6, p. 334-338: 2004

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, **Brazilian Journal of Zoology**, v. 253, p. 113-120: 2001

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN. D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p. 403-410: 1990

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica. **Relatório de Acompanhamento de Estudos e Projetos de Usinas Hidrelétricas** de 18/10/2013. Site: <http://www.aneel.gov.br/area.cfm?idArea=428>. Acessado em 22/10/2013: 2013

ANTONIO, R. R.; AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; BAILLY, D.; OKADA, E. K.; DIAS, J. H. P. Blockage of migration routes by dam construction: can migratory fish find alternative routes? **Neotropical Ichthyology**. v. 5, n. 2, p.177-184: 2007

BANDEL, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37 - 48: 1999

BIG – ANEEL. Banco de Informações de Geração. Site: <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.cfm> - acessado em 24/10/2013 às 10h41: 2013

BRASIL, **Boletim estatístico de pesca e aquicultura: Brasil, 2010**. Ministério da Pesca e Aquicultura. Brasília (DF): 2012

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Family Prochilodontidae (Flannel mouth characiforms). In REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre (RS). EDIPUCRS. 742p: 2003

CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1, p. 1-29: 2006

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014: 1996

CRONIN, M. A.; SPEARMAN, W. J. ; WILMOT, R. L.; PATTON, J. C.; BICKHAM, J. W. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O.keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 50, p. 708-715: 1993

CRUZEIRO DO SUL. Consórcio Energético Cruzeiro do Sul – UHE Mauá. Site: <http://www.usinamaua.com.br/> - acessado em 22/10/2013 às 11:01h: 2013

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

DIAS, J. H.; BRITTO, S. G. C.; VIANNA, N. C.; GARAVELLO, J .C. Biological and ecological aspects of *Pinirampus pinirampu* (Spix, 1829), Siluriformes, Pimelodidae, in Capivara reservoir , Paranapanema River, Southern Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**. v.16, n. 3, p. 293-304: 2004

DUKE-ENERGY – Geração Paranapanema. **Peixes do rio Paranapanema – Edição revisada e ampliada**. Editora Horizonte Geográfico. São Paulo (SP): 2003

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**. v. 4, n. 2, p. 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7: : 2012

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620: 2005

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p. 564-567: 2010

FLUXUS TECHNOLOGY Ltd - <http://www.fluxus-engineering.com>

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons Ltd, England: 2005

FUGI, R.; HAHN, N. S.; AGOSTINHO, A. A. Feeding styles of five species of bottom-feeding fishes of the high Paraná River. **Environmental Biology of Fishes**, v. 46, n. 3, p. 297-307: 1996

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

GODINHO, A. L.; KYNARD, B. Migration and spawning of radio-tagged zulega *Prochilodus argenteus* in a dammed Brazilian River. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 135, n. 3, p. 811-824: 2006

GODOY, M. P. Age, growth, sexual maturity, behavior, migration, tagging, and transplantation of the curimatá (*Prochilodus scrofa*Steindachner, 1881) of the Mogi Guassu River, São Paulo State, Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 31, p. 447–477: 1959

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil (Fishes of Brazil)**. Franciscana Piracicaba, Brazil: 1975

GOUDET, J. FSTAT a computer package for PCs which estimates and tests gene diversities and differentiation statistics from codominant genetic markers. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>

GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines e anchovies and lessons for conservation. **The Journal of Heredity**. v.89, n.5, p.415-426: 1998

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98: 1999

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª Ed, Editora Artmed. Porto Alegre, RS: 2010

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JR, P. M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v. 126 (1-2), p.153-159: 2006

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

HOFFMANN, A. C.; ORSI, M. L.; SHIBATTA, O. A. Diversidade de peixes do reservatório da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná, Brasil, ea importância dos grandes tributários na sua manutenção. **Iheringia, Série Zoológica**, v. 95, n. 3, p. 319-325: 2005

HOLLANDA CARVALHO, P. Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae). Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Biologia-Genética. 2011

LOPES, T. D. S.; RIBEIRO, R. P.; BARRERO, N. M. L.; SIROL, R. N.; POVH, J. A.; GOMES, P. C.; VARGAS, L. Caracterização genética de estoques de curimba ("*Prochilodus lineatus*") utilizados em programas de repovoamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. , p. 652 - 661: 2008

LOPES, C. M.; ALMEIDA, F. S. D.; ORSI, M. L.; BRITTO, S. G. D. C.; SIROL, R. N.; SODRÉ, L. M. K. Fish passage ladders from Canoas Complex- Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis*(Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 131-138: 2007

LORENZEN, K.; BEVERIDGE, M.; MANGEL, M. Cultured fish: integrative biology and management of domestication and interactions with wild fish. **Biological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 639-660: 2012

LOWE, T. M.; EDDY, S. R. "tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence". **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 955 - 964: 1997

MAKRAKIS, S.; MAKRAKIS, M. C.; WAGNER, R. L.; DIAS, J. H. P.; GOMES, L. C. Utilization of the fish ladder at the Engenheiro Sergio Motta Dam, Brazil, by long distance migrating potamodromous species. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 197-204: 2007

MANCERA-RODRÍGUEZ, N. J.; MARQUEZ, E. J.; HURTADO-ALARCÓN, J. C. Uso de citogenética y técnicas moleculares en estudios de diversidad genética en peces colombianos – Cap. 06, p. 237 – 312. In: ALBEIRO, L. H. **Biología Molecular Aplicada a la producción Animal y la Conservación de Especies Silvestres**. Editorial Universidad Nacional de Colombia: 2013

MEYER, A.; KOCHER, T. D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A. C. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**, v.347, p. 550-553: 1990

ORSI, M. L. **Estratégias reprodutivas de peixes da região média-baixa do rio Paranapanema, reservatório de Capivara**. Editora Edgard Blucher. São Paulo – SP: 2010

PADHI, A. Genetic evidence of multiple matrilineal lineages of the channel catfish, *Ictalurus punctatus* in North America. **Conservation Genetics**: 2013. DOI 10.1007/s10592-013-0479-6

- PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; JULIO JR, H. F.; AGOSTINHO, C. S.; PRIOLI, L. M. Molecular variability in *Brycon cf. pesu* Müller and Troschel, 1845 (Characiformes: Characidae) from the Araguaia-Tocantins basin. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 95-106: 2008
- PAULA, F. M. Diversidade genética de *Prochilodus Lineatus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do Complexo Canoas - Rio Paranapanema. Dissertação apresentada ao curso 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. 2006
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENEALX 6: genetic analysis in Excel - Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** v. 6, p. 288-295: 2006
- PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, A. A. Fish-Passage Facilities as Ecological Traps in Large Neotropical Rivers. **Conservation Biology**. v. 22, n. 1, p. 180–188: 2008
- PETRETERE JR, M. Fisheries in large tropical reservoirs in South America. **Lakes & Reservoirs: Research & Management**, v. 2, (1-2), p. 111-133: 1996
- PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P. D.; GALETTI JR, P. M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 1039-1050: 2008
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959: 2000
- RAMOS, J. V. B.; SODRÉ, L. M. K.; ORSI, M. L.; ALMEIDA, F. S. Genetic diversity of the species *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes) in the Canoas Complex - Paranapanema River. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 821 – 828: 2012
- 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. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3: 1997
- RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225: 1989
- RUEDA, E. C.; CARRIQUIRIBORDE, P.; MONZÓN, A. M.; SOMOZA, G. M.; ORTÍ, G. Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. **Genetica**, v. 141(7-9), p. 401-407: 2013

RUEDA, E. C.; SOMMER, J.; SCARABOTTI, P.; MARKARIANI, R.; ORTÍ, G. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite *loci* in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, p. 681 – 684: 2011

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 33 –44: 2007

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234: 2000

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v.10, p. 407– 417: 2001

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457-462: 1995

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739: 2011

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680: 1994

TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. **1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology** - Ribeirão Preto: 2003

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. F. (2004). Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538: 2004

VAZZOLER, A. E. A. M.; SUZUKI, H. I.; MARQUES, E. E.; LIZAMA, M. A. P. Primeira maturação gonadal, período e áreas de reprodução. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. A planície de inundação do alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Ed. EDUEM – NUPÉLIA - Maringá – PR, p. 249 - 265:1997

VIANNA, N. C.; NOGUEIRA, M. G. Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 20, p. 139-151: 2008

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370: 1984

WILSON, G. A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics**, 163, 1177–1191: 2003

WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations. University of Chicago, Chicago: 1978

YAZBECK, G. M.; KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 1026-1034: 2007.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T.J.; XIYAN, J. M. Pop Gene 32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v.1.32. **Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta**, Edmonton, Alberta, Canada, 2000.

4.5 Capítulo 5

DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE *Brycon nattereri* Günther, 1864 (OSTEICHTHYES; CHARACIDAE) ESPÉCIE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO

Este artigo será submetido à revista *Freshwater Biology*

Diversidade genética de uma população de *Brycon nattereri* Günther, 1864 (Osteichthyes; Characidae) uma espécie ameaçada de extinção

RESUMO

Brycon nattereri, popularmente conhecida como “Pirapitinga”, é uma espécie de peixe Neotropical, aparentemente sensível à degradação ambiental e reconhecidamente ameaçada de extinção. Assim, o presente trabalho teve por objetivos analisar a diversidade genética de *B. nattereri* encontrada no rio Laranjinha por meio de marcadores microssatélite e da região controladora (*D-loop*) do DNA mitocondrial. As análises de microssatélites de 40 indivíduos de *B. nattereri* revelaram um total de 35 alelos e medidas de heterozigosidade observada e esperada de 0,6167 e 0,6015, respectivamente. O valor de Fis não foi significativo e não foram encontrados desvios significativos do EHW, nem tampouco evidências de *bottlenecks* recentes na população estudada. O sequenciamento de um segmento de cerca de 497 pb da região *D-loop*, revelou a existência de apenas três sítios variáveis, que originaram quatro haplótipos diferentes. Os resultados mostraram uma diversidade haplotípica de 0,650 e diversidade nucleotídica extremamente baixa (0,015%). O baixo número de haplótipos e de diversidade nucleotídica indicam que esta população possa ter sofrido uma redução em seu tamanho, o qual levou a declínios na diversidade genética do genoma mitocondrial. Contudo, tal *bottleneck* não afetou os níveis atuais de diversidade genética dos microssatélites. Apesar de isolada na região alta do rio Laranjinha, os níveis de diversidade genética encontrados para esta população são considerados satisfatórios quando comparados a de outras espécies neotropicais. Medidas de recuperação de ambientes, por meio de recomposição de matas e melhoria da qualidade da água são necessárias para a manutenção e expansão desta população. Estes dados servem como parâmetros para futuros programas de monitoramento, e ainda, por suas exigências ambientais e características biológicas acreditamos que *Brycon nattereri* possa servir como espécie bandeira para a preservação e recuperação do rio Laranjinha.

Palavras chave: *Espécies ameaçadas, Brycon, D-loop, microssatélite, transferabilidade, diversidade genética.*

1 INTRODUÇÃO

Das mais de 2.500 espécies de peixes de água doce que ocorrem no Brasil (BUCKUP et al., 2007) 135 compõem a atual lista nacional de espécies ameaçadas de extinção e outras sete encontram-se num estado de sobre-exploração ou ameaçadas de sobre-exploração, contudo, sabe-se que estes números estão subestimados (ROSA e LIMA, 2008). O simples fato de algumas espécies constarem em alguma destas listas representa uma ameaça de extinção global ou local, e que a área em questão necessita de medidas apropriadas para sua conservação (SIMIC et al., 2007).

Brycon nattereri Günther, 1864 (Characiformes, Characidae), conhecida popularmente como Pirapitinga, é umas das espécies de peixes que atualmente encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção (ROSA e LIMA, 2008). *Brycon nattereri* pertence à subfamília Bryconinae, a qual se distribui do sul do México à Argentina (NELSON, 2006). Os peixes desta subfamília são caracídeos de médio a grande porte, seu comprimento padrão máximo que pode variar de 15 cm em *Brycon pesu* a 70cm em *Brycon orbygnianus* e *Brycon amazonicus* (LIMA, 2003).

B. nattereri distribui-se pelas bacias do Alto rio Paraná, Alto rio Tocantins e do São Francisco (LIMA et al., 2008). Particularmente na bacia do rio Paraná, registros mais recentes desta espécie têm sido feitos por Viana et al. (2013) na bacia do rio Ivaí, Pavanelli et al. (2007) no rio Corumbá, Shibatta; Gealh e Bennemann (2007) no rio Tibagi, Pompeu et al. (2009) e Casarim, Bueno e Pompeu (2012) e Belei e Sampaio (2012) em rios da bacia rio Grande. Esta espécie, é extremamente exigente e restrita a ambientes bem conservados, sendo seus registros geralmente relacionados a características que remetem a ambientes que possuem mata ciliar íntegra, boa oxigenação da água, e geralmente restrito às cabeceiras dos rios e tributários destas regiões (VIEIRA et al., 2005; SHIBATTA; GEALH e BENNEMANN, 2007; POMPEU et al., 2009; CASARIM et al., 2012). Segundo Lima (2008), esta espécie é restrita a rios de médio porte, com águas claras, correnteza moderada e matas ciliares bem preservadas, não ocorrendo em grandes planícies de inundação. São peixes onívoros e dependem de itens oriundos das matas ciliares tais como, frutos, flores, folhas, sementes e artrópodes terrestres.

O gênero *Brycon*, possui cerca de 40 espécies (LIMA, 2003), sendo de grande importância econômica, pois são utilizados para a alimentação, pesca, criação em

cativeiro e para o turismo em algumas regiões (LIMA, 2003; SABINO e ANDRADE, 2003; NELSON, 2006). Apesar de sua importância, seis espécies deste gênero, aproximadamente 15%, figuram na lista de espécies ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente do Brasil (ROSA e LIMA, 2008).

A espécie *Brycon nattereri*, segundo a Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004 - Anexo I, consta na lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes ameaçadas de extinção. Também está presente no Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, publicado pelo Ministério do Meio Ambiente (ROSA e LIMA, 2008). No estado do Paraná Mikich e Bérnils (2004) colocam *B. nattereri* na categoria de espécie vulnerável, que significa que o táxon enfrenta um alto risco de extinção na natureza.

Shibatta; Gealh e Bennemann (2007) ao capturarem alguns indivíduos na bacia do rio Tibagi, um importante rio do estado do Paraná, atribuíram sua ocorrência ao estado de conservação das matas ser relativamente bom. Porém os autores alertam que o fato da população ser pequena é um indício de que o atual estado de conservação já não é suficiente para sustentar grandes populações. Este foi o primeiro registro da espécie no estado do Paraná (MIKICH e BÉRNILS, 2004; ROSA e LIMA, 2008;). Ainda Viana et al. (2013) capturaram um único indivíduo na bacia do rio Ivaí, podendo ser considerado o segundo registro para o Estado do Paraná.

Aparentemente a construção de barramentos, a destruição de florestas ciliares e a poluição dos rios estão entre as principais ameaças à *B. nattereri*, pois acabam descaracterizando os ambientes preferidos por esta espécie que geralmente são lóticos, com boa qualidade de água e disponibilidade de recursos alóctones (MIKICH e BÉRNILS, 2004; VIEIRA et al., 2005; SHIBATTA; GEALH e BENNEMANN, 2007; LIMA et al., 2008; ROSA e LIMA, 2008; POMPEU et al., 2009).

Uma das medidas importantes que devem ser dirigidas ao estudo de espécies ameaçadas de extinção é, sem dúvida alguma, o acesso ao conhecimento da diversidade genética de populações destas espécies. Mamuris et al. (2005), estudando uma espécie de peixe ameaçada de extinção, ressalta a importância de obtenção de informações genéticas antes de se implementar ações de conservação. Mesmo espécies consideradas “quase ameaçadas” ou de “menor preocupação” podem enfrentar perda de diversidade genética intraespecífica, sem ter sido esta diversidade sequer reconhecida. O

monitoramento genético destas espécies deve ser garantido afim de que se tenha um quadro apropriado do nível de ameaça genética (LAIKRE et al., 2008).

Laikre et al. (2008) definem que o monitoramento genético para a conservação consiste num levantamento da quantidade de variação genética, composição genética, e estrutura genética espacial objetivando detectar mudanças potenciais nestes parâmetros, que podem resultar ou refletir em perda de variabilidade em nível genético. Classificar a informação sobre a composição genética, sobre sua área de distribuição é um pré-requisito importante para monitoramento genético. Estas informações fornecem um ponto de partida, com o qual as características genéticas podem ser comparadas posteriormente.

Devido à importância e estado de ameaça do gênero *Brycon*, diversos autores têm conduzido trabalhos genéticos, por meio de marcadores moleculares, em busca de informações sobre sua biologia, diversidade e estrutura genéticas, comportamento reprodutivo em populações naturais e de cativeiro. Estas pesquisas, invariavelmente fornecem informações importantes para o manejo e conservação deste gênero, que certamente poderiam auxiliar em programas de manejo e conservação (WASKO e GALETTI JR, 2002; HILSDORF et al., 2002; WASCO et al., 2004; BARROSO et al., 2005; LÓPEZ, 2006; SANCHES e GALETTI JR, 2007; LOPERA-BARRERO, 2009; MATSUMOTO e HILSDORF, 2009; LOPERA-BARRERO et al., 2010; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2010).

O rio Laranjinha é um importante corpo d'água do estado do Paraná, ao longo de seu curso atravessa essencialmente ambientes agrícolas e sofre diversos tipos de perturbações, tais como, remoção de mata ciliar, lançamento de efluentes domésticos, industriais e agrícola além da construção de pequenas barragens. Apesar de sua importância, o rio Laranjinha nunca teve sua diversidade de peixes inventariada, apenas Vianna e Nogueira (2008) coletaram em um único trecho do rio Laranjinha durante um trabalho sobre o ictioplâncton e fatores limnológicos do rio das Cinzas. Desde 2010 nosso grupo de pesquisa vem se dedicando especificamente a um levantamento da biodiversidade de peixes do rio Laranjinha, neste período identificamos aproximadamente uma centena de espécies, dentre elas uma população de *Brycon nattereri*.

Diversas publicações atuais consideram prioritárias para a conservação de *B. nattereri* ações que visem a identificação e preservação de áreas onde existam populações saudáveis da espécie, incluindo os sistemas fluviais e suas matas ciliares. Informações sobre sua distribuição e história natural são igualmente fundamentais (MIKICH e BÉRNILS, 2004; LIMA et al., 2008; ROSA e LIMA, 2008)

Assim, o presente trabalho teve por objetivo diagnosticar a diversidade genética presente em uma população de *Brycon nattereri* encontrada no rio Laranjinha, fornecendo informações que podem balizar trabalhos futuros e ações que objetivem a conservação desta espécie.

2 METODOLOGIA

2.1 Amostragens

Uma única população de *Brycon nattereri* (Figura 1) do rio Laranjinha, foi encontrada no município de Ventania, Paraná (24°1'36,6''S / 50°11'21,6''O) (Figura 2). Este trecho localiza-se dentro de uma área particular que se dedica à plantação de árvores para produção de madeira, neste local foram realizadas sete coletas sazonais no período de outubro de 2010 a abril de 2012. As coletas para amostragens tiveram duração de 24 hs. Para a coleta dos exemplares foram utilizadas redes de espera com malhas variáveis. Sempre que possível, os exemplares capturados foram marcados (Figura 3 A, B e C) para evitar reamostragem de tecidos, e devolvidos à água após a retirada de uma parte da nadadeira pélvica (Figura 3 D). Estas amostras de tecido, foram acondicionadas em etanol 95% e mantidas em gelo, posteriormente armazenadas à -20°C. Eventualmente, quando ocorria a morte de algum exemplar após a captura este era fixado em formol e depositado na coleção ictiológica da UENP como testemunha.



Figura 1 – Exemplar de *Brycon nattereri* coletado no rio Laranjinha (Ventania – PR) - CP: 21,2 cm – RG: 9990 (Foto: GECON, 2012).

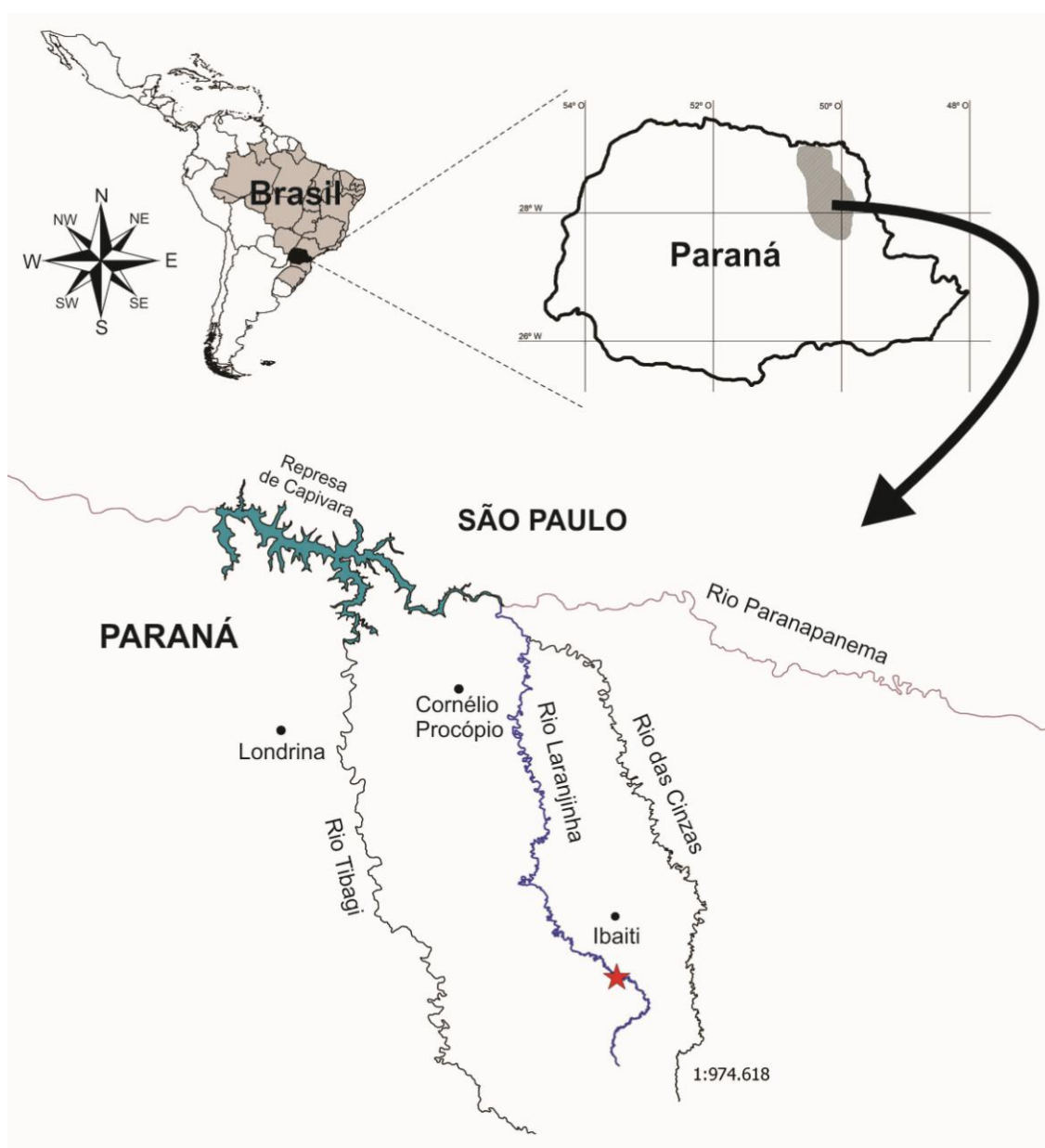


Figura 2 – Mapa do trecho de coleta de *Brycon nattereri* no rio Laranjinha a estrela vermelha indica o trecho de coleta no município de Ventania (PR) (Fonte: do autor).

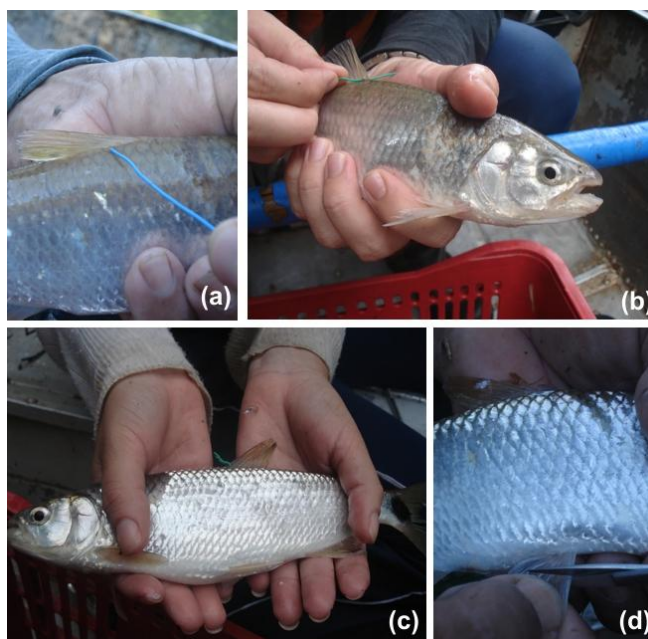


Figura 3 – Procedimento de marcação (A, B e C), amostragem (D) para posterior soltura de exemplares de *Brycon nattereri* (FONTE: GECON).

2.2 Extração do DNA

Foi realizada a extração de DNA de 40 indivíduos por um método de lavagens de fenol/clorofórmio segundo protocolo de Almeida, Fungaro e Sodr  (2001). Posteriormente as amostras foram diluídas em tampão TE (Tris HCl - pH 8,0 10 Mm, EDTA 1mM) em uma dilui o de 2:3 e quantificadas em fluor metro Qubit (Invitrogen) com o kit comercial QUANT-IT DSDNA BR (Invitrogen), e diluídas para uma concentra o de 5 ng/ μ L.

2.3 Marcadores Microsatélite

Testes de amplifica o heteróloga

Por se tratar do primeiro estudo sobre a diversidade genética de *Brycon nattereri*, ainda não existem *primers* de microsatélites descritos para esta espécie. Então, inicialmente testamos a amplifica o heteróloga, ou transferabilidade, de *primers* descritos para outras espécies do mesmo gênero: Bh - *Brycon hilarii* (SANCHES e GALETTI JR, 2006), BoM - *Brycon opalinus* (BARROSO et al., 2003), Bc - *Brycon*

cephalus (MATSUMOTO e HILSDORF, 2009), e da mesma ordem: *Astyanax fasciatus* (STRECKER, 2003), *Prochilodus argenteus* (BARBOSA et al., 2008), *Leporinus macrocephalus* (MORELLI et al., 2007), *Piaractus mesopotamicus* (CALCAGNOTTO; RUSSELLO e DeSALLE et al., 2001).

Inicialmente três indivíduos foram utilizados para verificar a amplificação heteróloga dos conjuntos de *primers* em reações de 10 µL, utilizando o kit comercial GoTaq® Green Master Mix, 2x – (Promega), com as concentrações de *primers* determinada pelos autores, e 2 µL de DNA em diferentes concentrações, 5 ng/µL, 0,5 ng/µL, 0,05 ng/µL e 0,005 ng/µL; Seguindo a programação do termociclador estabelecida pelos autores. Os *primers* que apresentaram uma amplificação relativamente satisfatória, ainda que com a presença de bandas inespecíficas, foram, então, selecionados para a etapa de otimizações da temperatura de pareamento e tempo de extensão final.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 8% em tampão de corrida TEB (Tris 0,89M; ácido bórico 0,89 M e EDTA 0,01 M pH 8,3) na concentração de 1:10, a 200V por duas horas, acompanhados de um marcador de peso molecular 10 pb. Os géis foram corados com nitrato de prata, iluminados por luz branca em negatoscópio e fotografados com câmera fotográfica digital.

Análise de diversidade genética por meio de microssatélites

Os *primers* que apresentaram amplificação heteróloga satisfatória foram, então, empregados nas análises populacionais, as quais foram feitas por meio da genotipagem em sequenciador automático (Genetic Analyzer – modelo: 3500XL/ Applied Biosystems). Para tanto, na reação de PCR foi realizado um procedimento de marcação com fluoróforos dos produtos de PCR usando-se metodologia proposta por Schuelke (2000). Neste procedimento foram utilizados três *primers* diferentes por reação, um *primer* sequência específica com uma sequência “cauda” do *primer* universal M13 (-21) ligado à sua extremidade 5' (F+M13), o *primer* sequência específica R e o *primer* universal M13 (-21) marcado com fluorocromo 6-FAM, NED ou HEX. A quantidade de *primer* F+M13 utilizada foi dez vezes menor do que do *primer* R. As condições do

termociclador foram ajustadas de tal forma que durante os primeiros ciclos o *primer* F com a sequência M13(-21) pudesse ser incorporada e acumulada nos produtos de PCR. Posteriormente, após o *primer* F+M13 se esgotar a temperatura de pareamento foi abaixada para facilitar o pareamento do *primer* universal M13(-21) (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'), o qual passa a fazer o papel do *primer* F, incorporando a marcação fluorescente aos produtos de PCR.

Foram utilizadas reações de PCR de 5 μ L contendo 1X GoTaq® Master Mix Colorless (Promega), 10 ng de DNA molde, 1% de glicerol, 0,125 μ M de *primer* (M13) marcado com fluorocromo (FAM, HEX or NED, Applied Biosystems, CA), 0,125 μ M *primer* R, 0,0125 μ M do *primer* F+M13. As amplificações foram realizadas com uma desnaturação inicial de 94°C por 4 min, seguida por 35 ciclos de 94° por 40 s, 50°C (BoM2), 53,3 °C (BoM5), 45°C (BoM6), 48°C (Bh6), 56°C (Bh13), 56°C (Bc48-6) por 1 min, 72°C por 1min e uma extensão final de 30 min a 72°C. Os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 2:3 em água ultrapura. A microplaca de sequenciamento foi preparada adicionando em cada poço: 2 μ L do produto de PCR diluído, 8 μ L de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, CA) e 0,1 μ L do marcador de pares de bases GeneScan LIZ 600 (Applied Biosystems, CA).

Os produtos de PCR marcados com fluorescência, foram genotipados em sequenciador automatizado (Genetic Analyzer – modelo: 3500XL/ Applied Biosystems). Os dados fornecidos pelo sequenciador foram analisados, por meio do programa GeneMarker v.1.85, seguido por uma checagem manual.

O programa POPGENE 1.32 – *Population Genetic Analysis* (YEH et al., 2000) foi utilizado para a determinação do número de alelos (NA), número de alelos efetivos (Ne), índice de Shannon (I), heterozigosidade observada (*Ho*) e esperada (*He*), heterozigosidade esperada de Nei (*Hs*). O teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EWH) e a presença de desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* foi calculado pelo programa GENEPOP 4.0.10 (ROUSSET, 2008; RAYMOND e ROUSSET, 1995); subsequentemente os P valores foram ajustados pela correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989). O cálculo do coeficiente de endogamia (*Fis*) para cada *locus* e para a população como um todo foi calculado pelo programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (EXCOFFIER et al., 2010). O programa BOTTLENECK 1.2.02 (CORNUET e LUIKART, 1996) foi utilizado para verificar evidências de uma redução recente no

tamanho populacional pelo excesso ou deficiência de heterozigotos pelos modelos evolutivos para locos de microssatélites, *Infinite Alleles Model* (IAM), *Two-Phase Model* (TPM – com 90% SMM e 10% IAM) e *Stepwise Mutation Model* (SMM). O nível de significância do excesso ou deficiência de heterozigotos foi determinado pelo teste de Wilcoxon. A presença de alelos nulos, erros de análise e presença de alelos dropout (dominância de alelo pequeno), que poderiam levar a desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testadas pelo programa MICROCHECKER v.2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). A probabilidade de exclusão de paternidade (Q) (WEIR, 1996) e a probabilidade de identidade genética (I) (PAETKAU et al., 1995) foram estimadas pelo Identity 1.0 (WAGNER e SEFC, 1999). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi obtido pelo Cervus v.3.0 (MARSHALL et al., 1998).

Análise de diversidade da região controladora do DNA mitocondrial – D-loop

A região controle do DNA mitocondrial foi parcialmente amplificada de acordo com Panarari-Antunes et al. (2008), que utilizaram os *primers* L 5'-AGAGCGTCGGTCTTGTAACC-3' (CRONIN et al., 1993) e H 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (MEYER et al., 1990) para outra espécie do gênero *Brycon*. Foram realizadas reações de 25 µL contendo 1X GoTaq® Master Mix Colorless (Promega), 1µM de cada *primer*, e 3 µL de DNA na concentração de 0,005 ng/µL. As amostras foram colocadas em termociclador MJ96+/MJ96G Biocycler utilizando uma desnaturação inicial de 3 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s a 55°C e 2 min a 72°C, uma extensão final de 10 min a 72°C. Em seguida parte do produto de PCR foi purificado pela enzima exonuclease ExoSAP-IT (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

Para as reações de sequenciamento foi utilizado o kit BigDye Terminator™ kit (v. 3.1 – Applied Biosystems), utilizando 0,5 µM de um dos *primers* e 1µL do produto de PCR purificado, seguindo as instruções do kit. Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados por precipitação com EDTA e etanol (5 µL de EDTA 125 Mm + 60 µL de etanol absoluto), então foram adicionados 10µL Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, CA) e posteriormente sequenciados em seqüenciador automatizado (Genetic Analyzer – modelo: 3500XL / Applied Biosystems).

A análise de qualidade das sequências e geração dos *contigs* foi feita pelo aplicativo on-line *Electropherogram Quality Analysis* (TOGAWA e BRIGIDO, 2003), acessado em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Posteriormente as sequências foram checadas manualmente por meio do programa DNA Baser v. 3.5.5.216 (Heracle BioSoft SRL) e alinhadas pelo aplicativo Clustal W (THOMPSON, 1994) no programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999).

As sequências foram submetidas a uma busca no BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1990) na página do NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, acessada em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. O programa tRNAscan-SE (LOWE e EDDY, 1997) foi utilizado on-line no sítio: <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/> para buscar possíveis tRNA. As sequências dos diferentes haplótipos encontrados foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

O programa DnaSP v5 (LIBRADO e ROZAS, 2009) foi utilizado no cálculo do número de haplótipos, diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica. Os testes de neutralidade seletiva de amostras aleatórias de sequências de DNA sobre o modelo de sítios infinitos de Tajima (D) e Fu (Fs), a determinação dos haplótipos e as estimativas de frequências haplotípicas foram realizados por meio do programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (EXCOFFIER et al., 2010).

A rede de haplótipos foi gerada por meio do programa Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd - <http://www.fluxus-engineering.com>), baseado no algoritmo *median-joining* (BANDELTA et al., 1999).

3 RESULTADOS

3.1 Amplificação heteróloga de primers de microssatélite

Dos 32 pares de *primers* testados 10 apresentaram amplificação heteróloga satisfatória, livre de amplificações inespecíficas; destes, quatro foram monomórficos, mesmo quando o número de indivíduos testados foi elevado para 15, enquanto seis (BoM 2, BoM 5, BoM 6, Bh 6, Bh 13 e Bc48-06) *primers* apresentaram amplificação polimórfica satisfatória (Tabela 1).

3.2 Diversidade genética com marcadores microssatélite

Os seis *locus* polimórficos analisados, produziram um total de 35 alelos. O número de alelos produzidos por cada *locus* variou de dois (BoM 2) a 12 (Bh 6), com uma média de 5,83 ($\pm 3,66$) alelos por *locus* (Tabela 2). O tamanho dos alelos variou de 128 pb (BoM 5 e Bc48-6) a 270 pb (Bh 6). Foram encontrados oito alelos raros (com frequência menor do que 5%) e 11 de baixa frequência (menor do que 10%).

Não foram detectadas evidências de erros de amostragens, seja pela presença de picos inespecíficos (*stutter*), por “alelos *dropout*” e ou por alelos nulos, para quaisquer dos *loci* amostrados. Não há evidências de que esta população tenha passado por um *bottleneck* recente por nenhum dos modelos evolutivos para locos de microssatélites, quais sejam: *Infinite Alleles Model* (IAM), *Two-Phase Model* (TPM) e *Stepwise Mutation Model* (SMM).

O conjunto de *loci* apresentou um PIC médio de 0,6015 e, com exceção de BoM 2, todos apresentaram valores de PIC acima de 0,5. Também apresentou uma alta probabilidade combinada de exclusão de paternidade ($Q=0,962$) e uma baixa probabilidade de identidade gênica ($I=2,9 \times 10^{-5}$).

O teste de desequilíbrio de ligação, seguido da correção sequencial de Bonferroni manteve-se significativo apenas entre os *loci* BoM 5 e BoM 6.

A média da heterozigosidade observada foi de 0,6167 ($\pm 0,2563$), enquanto que a esperada foi de 0,6015 ($\pm 0,2503$). Não foram observados valores significativos de coeficiente de endogamia (F_{is}) para nenhum *loci*, nem tampouco para a população como um todo, não foram constatados excesso, nem déficits nos números de heterozigotos. Também não foram observados desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para nenhum dos seis *loci* (Tabela 2). O índice de Shannon para a população estudada foi de 1,2267 ($\pm 0,6128$) e a heterozigosidade esperada de Nei (1973) foi de 0,5940 ($\pm 0,2472$) (Tabela 2)

Tabela 1 - Amplificação heteróloga de seis *primers* em *Brycon nattereri*. Temperatura de pareamento (Ta), número de alelos (NA), amplitude de peso dos alelos em pares de bases (pb), motivo proposto pelo autor que caracterizou o loco. Locus com a sigla BoM foram originalmente descritos para *Brycon opalinus* por Barroso et al. (2003); Bh foram descritos para *Brycon hilarii* por Sanches e Galetti (2006); Bc originalmente descrito para *Brycon cephalus* por Matsumoto e Hilsdorf (2009).

<i>Locus</i>	Motivo	Sequência 5'→3'	Ta (°C)	NA	Amplitude dos alelos (pb)
BoM 2	(CA)	F: CTGGGCAGCGGAAGAG R: CCCACATCTCTCCCCTTCG	50°C	2	144 - 146
BoM 5	(AC)T(AC)AT(AC)	F: CGACCACAATAGGATTAGGG R: CTGGAGTTTTGTGTGTGGA	53,3°C	7	128 - 155
BoM 6	(CA)TA(CA)T(CA)	F:GGAGTTTGTGTGTGGAGACCGAG R: GCACGCAGACACCAGA	45°C	7	154 - 180
Bh 6	(GT)	F: GCGTTGCGTGTGTATGTTAA R: AGAGGTGTCCACAAAGTTTT	48°C	12	224 - 270
Bh 13	(AT)	F: AGCAATTTAAGCAAGTGAAG R: GCGTCGGAGCAGTAGTTATA	56°C	4	168 - 180
Bc48-6	(CA)	F:GGAGGACAGTGAGTGGACG R:GTTTGCTTGGACATCTGC	56°C	3	128 - 132

Tabela 2 - Resultados de análises da diversidade genética em seis *loci* de microsatélite de uma população remanescente de *Brycon nattereri* encontrada no rio Laranjinha. Número de alelos (Na), número de alelos efetivos (Ne), heterozigosidade observada (*Ho*), heterozigosidade esperada (*He*), coeficiente de endogamia (*F_{is}*), P-valor para desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), heterozigosidade esperada de Nei (*Hs*), índice de Shannon (*I*). ^{NS} = não significativo. SD = desvio padrão.

<i>Locus</i>	Na	Ne	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F_{is}</i>	EHW	<i>Hs</i>	<i>I</i>
BoM 2	2	1,133	0,1250	0,1187	-0,05405 ^{NS}	1,0000 ^{NS}	0,1172	0,2338
BoM 5	7	3,893	0,7250	0,7525	0,03704 ^{NS}	0,9550 ^{NS}	0,7431	1,6013
BoM 6	7	3,879	0,7250	0,7516	0,03581 ^{NS}	0,9575 ^{NS}	0,7422	1,5873
Bh 6	12	4,494	0,8500	0,7873	-0,08068 ^{NS}	0,5457 ^{NS}	0,7775	1,9436
Bh 13	4	2,518	0,5750	0,6104	0,05876 ^{NS}	0,4822 ^{NS}	0,6028	1,0291
Bc48-6	3	2,386	0,7000	0,5883	-0,19279 ^{NS}	0,2159 ^{NS}	0,5809	0,9651
Média	5,8	3,051	0,6167	0,6015	-0,02559 ^{NS}		0,5940	1,2267
SD	3,66	1,256	0,2563	0,2503			0,2472	0,6128

3.3 Diversidade genética da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop)

Um fragmento de aproximadamente 600 pb (Figura 4) foi amplificado utilizando-se o par de *primers* propostos por Panarari-Antunes et al. (2008). Depois de purificado foram sequenciados 555 pb, incluindo 497 pb pertencente à região de controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) mais uma sequência flanqueadora de 58 pb relacionada ao tRNA-Pro.

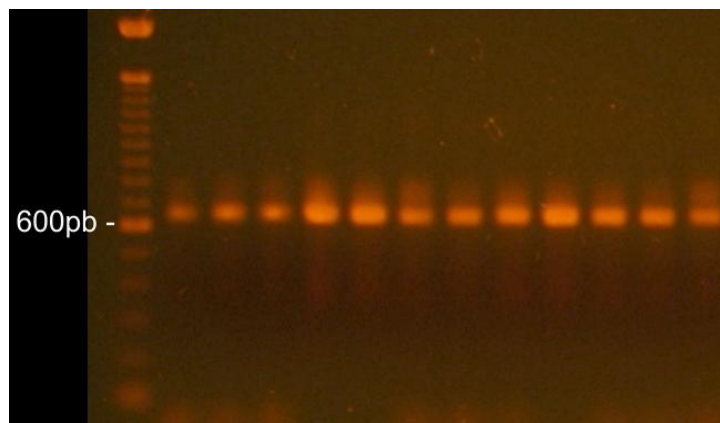


Figura 4 – Amplificação parcial da região controladora do DNA mitocondrial (*D-loop*) em exemplares de *Brycon nattereri*, de acordo com Panarari-Antunes et al. (2008), utilizando os *primers* L proposto por Cronin et al. (1993) e H descrito por Meyer et al. (1990) (FONTE: GECON).

Foram obtidos três sítios polimórficos, gerados por três mutações do tipo transição, e quatro haplótipos. As diversidades haplotípicas (*h*) e nucleotídica (*Pi*) foram, respectivamente, 0,650 ($\pm 0,045$) e 0,15%.

O haplótipo 1 (CGA) foi o mais frequente ocorrendo em 19 indivíduos enquanto o haplótipo 3 (TGG) foi o mais raro ocorrendo em apenas dois indivíduos (Tabela 3). A rede de haplótipos evidencia que os haplótipos 1, 3 e 4 derivam do haplótipo 2 (Figura 5).

Tabela 3 - Sítios variáveis de DNA mitocondrial entre quatro haplótipos da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) amostrados de 40 indivíduos de *Brycon nattereri*. Número de cada haplótipo na amostra (N).

Haplótipos	Posição do Nucleotídeo			N
	19	350	419	
Hap 1	C	G	A	19
Hap 2	T	G	A	14
Hap 3	T	G	G	2
Hap 4	T	A	A	5

Os testes de neutralidade de Tajima e Fu não foram significativos nem negativos, isto significa que as mutações no genoma mitocondriais são seletivamente neutras e que não há evidencia de expansão populacional.

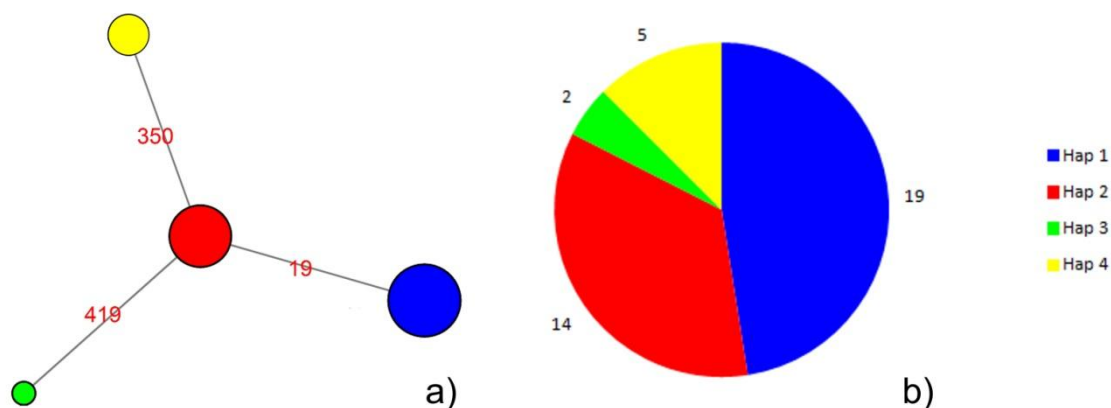


Figura 5 – a) rede de haplótipos de *Brycon nattereri* gerada por meio do programa Network 4.6.1.1, baseado no algoritmo *median-joining*, o tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo, números representam a posição da mutação na sequência; b) Gráfico com a proporção da distribuição dos haplótipos na população de *Brycon nattereri*.

4 DISCUSSÃO

4.1 Amplificação heteróloga (transferabilidade)

A amplificação heteróloga de *primers* de microssatélite entre espécies de peixe proximamente relacionadas é uma alternativa utilizada com sucesso por diversos autores, quando não estão disponíveis *primers* específicos (ABREU et al., 2009; RAMOS et al., 2012). Especialmente no gênero *Brycon* Matsumoto e Hilsdorf (2009) e López (2006) já haviam obtido sucesso na amplificação heteróloga.

Os altos valores de PIC, uma alta probabilidade combinada de exclusão de paternidade e a baixa probabilidade de identidade gênica demonstram uma boa aplicabilidade deste conjunto de *loci* em estudos de parentesco e diferenciação populacional.

Apesar dos *loci* BoM 5 e BoM 6 apresentarem-se em desequilíbrio de ligação na população analisada, tal fato não inviabiliza seu uso, pois Rueda et al. (2011), em um trabalho que propõe um conjunto de *primers* para outra espécie de Characiformes, encontraram pares de *primers*, que mostraram-se em desequilíbrio de ligação em uma dada população, mas não em outra. Os referidos autores atribuíram os resultados encontrados ao pequeno número amostral utilizado em suas populações, as quais eram de cerca de 20 indivíduos.

4.2 Análise da Diversidade Genética da população de *Brycon nattereri* por meio dos marcadores Microssatélite e D-loop

Laikre et al. (2008) alertam que diversos países apresentam programas para monitorar a biodiversidade em níveis de ecossistemas ou espécies, porém, ainda faltam programas para monitorar a composição genética e os níveis de diversidade genética, mesmo esta necessidade sendo repetidamente salientada. O monitoramento genético para a conservação das espécies poderia apresentar explicações em razões das mudanças observadas nos níveis de diversidade genética.

Freeland (2005) considera que, geralmente, o tamanho ideal da amostra populacional é pelo menos entre 30 e 40, entretanto, ressalta que isto dependerá, em

algum grau, da variabilidade do *locus* que se está caracterizando. Erros de amostragem poderiam causar erros na estimativa das frequências alélicas.

Os tamanhos amostrais utilizados em estudos populacionais de peixes neotropicais variam muito de acordo com a disponibilidade da espécie na natureza, bem como pelo esforço de coleta empregado. No gênero *Brycon*, os estudos com populações naturais, que utilizam marcadores microssatélite e de DNA mitocondrial, têm utilizado em média, um tamanho amostral de aproximadamente 29 indivíduos por população (HILSDORF et al., 2002; BARROSO et al., 2005; LÓPEZ, 2006; MATSUMOTO e HILSDORF, 2009). Com base nisto, podemos assegurar que o tamanho amostral de 40 indivíduos, utilizado no presente trabalho, foi adequado para acessar a diversidade genética de *Brycon nattereri*.

O número médio de alelos encontrados para os seis *loci* nesta população foi de 5,833 ($\pm 3,656$) e variou de 2 a 12 alelos por *locus*; valor este um pouco abaixo do valor médio entre espécies de peixes de água doce encontrado por DeWoody e Avise (2000), que foi de 9,1 ($\pm 6,1$). Porém, nossos valores são concordantes aos observados por Sanches e Galetti Jr (2006), que encontraram um número médio de alelos por *locus* de 5,57 para *Brycon hilarii*, e uma variação de três a oito alelos por *locus*.

Outras três espécies do gênero *Brycon*, também ameaçadas de extinção já tiveram suas diversidades genéticas analisadas por meio de marcadores microssatélites. Uma população de cativeiro de *Brycon orbignyanus* apresentou uma média de 2,8 alelos e uma variação de 2 a 3 alelos por *locus*, neste caso, os autores atribuíram o baixo número de alelos encontrados à dificuldade de se utilizar *loci* heterólogos (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2010). Exemplares de *Brycon insignis* Steindachner, 1877, provenientes de cinco populações selvagens e uma de cativeiro, apresentaram um número médio de alelos por *locus* variando de 5,8 a 9,4 (MATSUMOTO e HILSDORF, 2009). Uma terceira espécie, *Brycon opalinus*, teve sete populações selvagens e uma população de cativeiro analisada, e a média de alelos por *locus* por população variou de 5,43 a 15,14 (BARROSO et al., 2005). Ainda, López (2006) encontrou, em quatro populações de cativeiro e duas selvagens de *Brycon moorei sinuensis* Dahl, 1955, uma média de 7,83 alelos por *locus* e uma variação de 5 a 13 alelos.

Apesar de ser uma medida relativamete simples, a diversidade alélica é muito sensível ao tamanho da amostra, ou seja, o número de alelos depende, em parte, do número de indivíduos analisados; da mesma forma, a medida de heterozigosidade observada (H_o) está muito sujeita a erros amostrais. De modo diverso, a heterozigosidade esperada (H_e) é muito menos sensível do que as medidas de diversidade anteriores a efeitos de amostragem (FREELAND, 2005). Alguns autores têm demonstrado que, em geral, as espécies marinhas mantêm maiores níveis de diversidade intrapopulacional por conseguirem manter maiores tamanhos populacionais por maiores períodos de tempo (DeWOODY e AVISE, 2000; WARD, 2002).

As estimativas de H_o e H_e revelaram que os níveis de diversidade genética encontradas nesta população remanescente podem ser considerados satisfatórios, permanecendo próximos aos encontrados para outras espécies do mesmo gênero. Valores de heterozigosidade acima de 0,6 têm sido considerados como altos índices de diversidade genética em outras espécies (RAMOS et al., 2012), desta forma, apesar de tratarmos de uma espécie ameaçada de extinção, os valores encontrados não sugerem uma perda importante de diversidade genética observada pelos marcadores microssatélites.

O valor de H_o encontrado na amostra estudada foi superior ao valor médio de variação genética revelada por marcadores microssatélite para espécies de peixes de água doce 0,54 ($\pm 0,25$) (DeWOODY e AVISE, 2000). Também não encontramos diferenças contrastantes quando comparamos o H_o e H_e de *B. nattereri* à outras espécies do gênero *Brycon* estudadas com marcadores microssatélites, tais como, Sanches e Galetti Jr (2006) $H_o = 0,6514$ e $H_e = 0,6671$, Lopez (2006) $H_o = 0,51$ e $H_e = 0,74$, Barroso et al. (2005) $H_o = 0,495$ a $0,634$ e $H_e = 0,821$ a $0,892$. Matsumoto e Hilsdorf (2009) encontraram valores de $H_o = 0,77$ a $0,88$ e $H_e = 0,71$ a $0,83$ (Tabela 4)

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) representa a hipótese nula, que utilizamos como base de comparação para detecção de desvios de panmixia, migração, seleção entre outros (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010). Na população analisada, nenhum *locus* apresentou desvios significativos do EHW. Apesar do conjunto rigoroso de critérios que estão associados ao EHW, o equilíbrio é esperado para populações grandes e exogâmicas, para as quais os valores observados e esperados de heterozigosidade mostram-se concordantes para a maioria dos locos. Nesta situação os

locos em questão continuam sujeitos à mutação, migração, seleção e efeitos de amostragem, porém em níveis muito baixos para serem detectados em tamanhos amostrais realísticos (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010; FREELAND, 2005).

Tabela 4 - Parâmetros de diversidade genética dentro do gênero *Brycon*. N_{POP} = tamanho da amostra, S = amostra selvagem, C = amostra de cativeiro, ^{NS} = não significativo, NA = não avaliado, He = heterozigosidade esperada, Ho = heterozigosidade observada, EHW = Desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, $F_{IS POP}$ = Coeficiente de endogamia da população, Bottleneck = possibilidade da ocorrência de Bottleneck recente à partir de dados de microssatélite.

Parâmetro	Galindo et al., 2013	Rodriguez-Rodriguez et al., 2010	Matsumoto e Hilsdorf, 2009	Barroso et al., 2005	López, 2006	Sanches e Galetti Jr (2006)	DeWoody e Avise, 2000
Espécie	<i>B. nattereri</i>	<i>B. orbignyianus</i>	<i>B. insignis</i>	<i>B. opalinus</i>	<i>B. moorei sinuensis</i>	<i>B. hilarii</i>	---
N_{POP}	40 (1S)	44 (1C)	208 (5S+1C)	229 (7S+1C)	262 (2S+4C)	30 (1S)	---
N_A	35	14	61	162	47	39	---
\bar{N}_A	5,83	2,8	5,8 a 9,4	5,43 a 15,14	7,83	5,57	9,1
He	0,6015	0,607	0,71 a 0,83	0,821 a 0,892	0,74	0,6671	---
Ho	0,6167	0,907	0,77 a 0,88	0,495 a 0,634	0,51	0,6514	0,54
EHW	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	NA	---
$F_{IS POP}$	-0,02559 ^{NS}	-0,489	NA	0,148 a 0,414	0,304	NA	---
Bottleneck	Não	NA	Sim	NA	Sim	NA	---

O fato da população de *B. nattereri* não apresentar desvios do EHW e coeficiente de endogamia significativo, pode ser um indício de que esta população tem mantido um tamanho populacional efetivo relativamente satisfatório e suficiente para que não haja perda de diversidade genética por meio de fatores estocásticos, ou por consequências da endogamia. O que é um fator positivo, por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção.

A região controladora do DNA mitocondrial, *D-loop*, vem sendo amplamente utilizada principalmente no estudo de populações e filogeografia, pois é considerada a região que possui as maiores taxas de mutação (PRIOLI et al., 2002; WARD, 2002;

MARTINS et al., 2003; IERVOLINO et al., 2010; ARIAS e INFANTE-MALACHIAS, 2012).

A diversidade haplotípica (h) é o equivalente haploide da H_e de dados diploides (FREELAND, 2005). Os dados de diversidade genética da região D-loop do DNA mitocondrial ($h = 0,650 \pm 0,045$), corroboram àqueles encontrados pelos microssatélites ($H_e = 0,6015 \pm 0,2503$). Esta concordância entre os dados de SSR e D-loop já havia sido encontrada antes por Barroso et al. (2005) em *Brycon opalinus*.

Hilsdorf et al. (2002) analisando o DNA mitocondrial de *Brycon opalinus* por meio de cortes com enzimas de restrição obteve 27 haplótipos diferentes. Panarari-Antunes et al. (2008) analisando a região D-loop de outra espécie do gênero *Brycon* obtiveram 24 sítios nucleotídicos polimórficos, enquanto que em nosso trabalho encontramos apenas quatro haplótipos em três sítios polimórficos.

É importante, contudo, ressaltar que os trabalhos comparados anteriormente ao nosso foram realizados em no mínimo dois trechos de coleta, em áreas amostrais muito maiores. Por outro lado, quando comparadas populações equivalentes ou menores sempre verifica-se maiores índices de diversidade; por exemplo, Hilsdorf et al. (2002) encontraram 13 haplótipos diferentes em uma amostra com 42 indivíduos e 10 haplótipos em uma amostra de 40 indivíduos.

Hilsdorf et al. (2002), trabalhando com sete populações selvagens e uma de cativeiro, encontraram, uma diversidade haplotípica de 0,60 e 0,75 respectivamente, que neste caso é semelhante à encontrada para *B. nattereri*, entretanto as diversidades nucleotídicas média de 0,0072 na população natural e 0,0076 na população de cativeiro, apesar de baixas, ainda são bem superiores ao encontrado para *B. nattereri*.

Desta forma, apesar de uma diversidade haplotípica compatível com o encontrado para outra espécie do gênero *Brycon* (Hilsdorf et al. 2002) o número de haplótipos encontrados e de diversidade nucleotídica são notavelmente menores do que os encontrados para maioria das espécies de peixes neotropias estudados até o momento.

Os testes D de Tajima e Fs de Fu foram utilizados para verificar se as mutações que ocorreram no genoma mitocondrial são seletivamente neutras ou não e também se as sequências desviam significativamente do esperado para o modelo de expansão da

população (SANTOS, RUFFINO e FARIAS, 2007). Valores significativos para o teste D de Tajima podem ser relacionados à seleção, expansão populacional, *bottlenecks* e taxas de mutação distintas; mesmo valores negativos e não significativos podem indicar uma expansão populacional e precisam ser testados pelo teste F_s de F_u que é mais sensível à expansão populacional (GARCEZ, CALCAGNOTTO e ALMEIDA-TOLETO, 2011). Nossos resultados não foram significativos para ambos os testes, indicando que as mutações na região *D-loop* são seletivamente neutras.

O DNA mitocondrial é um marcador potencialmente mais sensível à deriva genética do que o DNA nuclear. Devido ao seu padrão de herança materna, e à natureza haploide do seu genoma seu tamanho efetivo populacional é um quarto do genoma nuclear, isto o torna mais sensível a eventos demográficos como *bottlenecks*, pois mesmo que a população se recupere rapidamente, restarão menos cópias de haplótipos mitocondriais comparados aos genes nucleares (BIRKY et al., 1983; WARD, 2002; FREELAND, 2005). Devido à este reduzido tamanho efetivo populacional Freeland (2005) chama atenção pois estes haplótipos tem uma grande probabilidade de tornarem-se extintos, e esta perda pode levar os pesquisadores a subestimar os níveis de diversidade genética.

Comparações entre o genoma nuclear e de organelas podem ser influenciadas pela história demográfica passada. Resultados conflitantes podem ser encontrados quando marcadores de genomas nucleares e de organelas são utilizados para detectar *bottlenecks* devido à maior sensibilidade de genomas de organelas a estes efeitos (FREELAND, 2005).

Entre as estatísticas do DNA mitocondrial, a diversidade nucleotídica tende a ser menos relacionada com a abundância de indivíduos do que o número de haplótipos e diversidade haplotípica. Uma das explicações, é que a intensidade destas relações entre diversidade genética e abundância populacional, reflete a taxa relativa com que diferentes estatísticas aumentam em valor após um episódio de baixa diversidade. A diversidade de microssatélites normalmente recupera-se mais rápido do que a diversidade do DNA mitocondrial. Dentre as estimativas do DNA mitocondrial, o número de haplótipos e a diversidade haplotípica respondem mais rapidamente do que a diversidade nucleotídica. Portanto, a diversidade nucleotídica pode ser mais influenciada por fatores históricos, como flutuações no tamanho populacional, gargalos,

vicariância, introgressão, “selective sweeps” comparado às outras estatísticas (MACCUSKER e BENTZEN, 2010).

Fica evidente que a utilização marcadores com diferentes naturezas e taxas de evolução para detectar a diversidade e estrutura genética de populações é extremamente importante, pois desta forma é possível acessar com mais precisão o histórico demográfico de uma população mesmo quando não estão disponíveis dados passados.

Em nosso trabalho, apesar dos marcadores microssatélite não evidenciarem a ocorrência de um *bottleneck* recente, os índices de diversidade genética do DNA mitocondrial, tais como o número de haplótipos e principalmente a diversidade nucleotídica foram visivelmente menores aos apresentados pela maioria das espécies de peixes neotropicais já estudadas, estas diferenças podem ter sido causadas por um gargalo populacional, que provavelmente devido ao menor tamanho efetivo do genoma mitocondrial, um quarto em referência ao nuclear (WARD, 2002), foi intenso suficiente para causar a perda de haplótipos, porém não o bastante, para afetar de maneira significativa o genoma nuclear. Segundo os parâmetros propostos por Grant e Bowen (1998), uma alta diversidade haplotípica acompanhada por uma baixa diversidade nucleotídica pode indicar um *bottleneck* seguido de um rápido crescimento populacional e acúmulo de mutações.

A possibilidade de algum evento passado ter causado uma redução aleatória no tamanho das populações deste trecho de coleta, um chamado *bottleneck*, é reforçada pelos dados obtidos por Ferreira (2013) que estudou a espécie *Geophagus brasiliensis* nesta mesma localidade por meio de marcadores Microssatélites, AFLP e D-loop. Apesar dos dados de microssatélite não evidenciarem um *bottleneck* recente, Ferreira encontrou apenas um haplótipo para a região controladora do DNA mitocondrial em 30 indivíduos analisados, adicionalmente, para os marcadores AFLP, encontrou menos da metade de *loci* polimórficos quando comparado aos demais trechos de coleta, estes dados evidenciam uma perda significativa de diversidade genética nesta localidade.

Situações em que há indícios de reduções no tamanho populacional pelo DNA mitocondrial, no entanto o DNA nuclear (microssatélite) não apresenta sinais de um *bottleneck* já foram evidenciadas por outros pesquisadores tais como Waits et al. (2000), neste caso provavelmente, o impacto do *bottleneck* foi duradouro sobre a diversidade genética do genoma mitocondrial e severa o suficiente para eliminar a maioria dos

haplótipos, entretanto, o impacto sobre os marcadores microssatélite foi mínimo, já que múltiplos alelos de microssatélite foram mantidos em cada subpopulação.

Uma situação semelhante pode ser observada entre os trabalhos desenvolvidos por Hilsdorf et al. (2002) e Barroso et al. (2005), respectivamente, com DNA mitocondrial e microssatélites. Nestes casos, em uma amostra de 38 indivíduos de uma localidade foi observado apenas um haplótipo do DNA mitocondrial, porém foram encontrados 73 alelos diferentes para sete *loci* de microssatélite, Hilsdorf et al. (2002) atribuem a ausência de diversidade de haplótipos mitocondriais a um processo de *bottleneck* causado pela destruição da vegetação ripária.

Outra explicação que pode ser dada a esta aparente discrepância entre as diversidades genéticas de marcadores microssatélites e mitocondriais, quanto à ocorrência ou não de um possível *bottleneck*, pode ser inferida à partir da observação da rede de haplótipos (Figura 4), verificamos que apenas um ponto mutacional separa os haplótipos 1, 3 e 4 do haplótipo 2, este último localiza-se na posição central da rede e possui múltiplas ligações que são indicativos de que este haplótipo pode ser o mais antigo (FREELAND, 2005), desta forma, pode ter sido o único a restar após o *bottleneck* que eliminou outros haplótipos.

Alternativamente, o efeito fundador pode ocasionar um sinal semelhante ao de um *bottleneck* em uma população, na região onde encontra-se esta população de *Brycon nattereri* há uma proximidade geográfica entre tributários do rio Laranjinha e do rio Tibagi (Figura 2 – Capítulo 3), e poderia configurar o local de entrada no rio Laranjinha de exemplares de *Brycon nattereri* advindos do rio Tibagi, ocasionando “perda” de haplótipos e posterior crescimento populacional e acúmulo de mutações conforme apontado por Grant e Bowen (1998).

Conforme citado anteriormente depois de um evento de baixa diversidade genética, os microssatélites se recuperam muito rapidamente em relação ao DNA mitocondrial, e considerando este último o número de haplótipos e diversidade haplotípica recuperam-se mais rapidamente do que a diversidade nucleotídica (MACCUSKER e BENTZEN, 2010). Verificamos que a diversidade apresentada pelos marcadores de microssatélite é satisfatória e próxima aos trabalhos com o mesmo gênero, Porém, a região *D-loop* apesar de apresentar uma diversidade haplotípica razoável, revelou um número de haplótipos relativamente baixo e níveis muito baixos

de diversidade nucleotídica, em comparação com outras espécies de peixes. Desta maneira, este *bottleneck* pode ter ocorrido há tempo suficiente para que a diversidade dos marcadores de microssatélite já tenham se recuperado, e para que o genoma mitocondrial comece a se recuperar (número de haplótipos e diversidade haplotípica), possuindo tanto haplótipos mais antigos, como originados recentemente ($H3 = 5\%$), todavia a diversidade nucleotídica ainda permanece baixa por necessitar de um maior tempo de recuperação.

Os alelos e haplótipos que são extintos em uma população podem ser repostos por mutação, mas devido às baixas taxas em que ocorrem recuperar a variação de um loco poderia levar milhares ou milhões de gerações. Ao contrário, o fluxo gênico, entre populações geneticamente diferenciadas pode restaurar rapidamente a diversidade genética (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2010), desta maneira recuperando alelos perdidos anteriormente. Para que isto ocorra é necessário que o alelo ainda esteja presente em outras populações.

Considerando que em nosso trabalho utilizamos indivíduos oriundos de uma única população natural, que encontra-se provavelmente isolada na porção alta do rio Laranjinha podemos dizer que nossos níveis de diversidade genética são satisfatórios tanto no que se refere aos marcadores de microssatélite, como no que se refere ao DNA mitocondrial, que apesar de apresentar uma diversidade nucleotídica muito abaixo de outras espécies, ainda existem quatro haplótipos diferentes.

Os dados aqui encontrados, além de fornecerem o primeiro diagnóstico da diversidade genética para *B. nattereri*, também devem servir de base para um programa de monitoramento da diversidade genética de longa duração, tal como sugerido por Hilsdorf et al. (2002), onde o autor afirma que a composição haplotípica encontrada em seu trabalho com *B. opalinus* serve como um parâmetro para monitorar a variação temporal nas frequências dos haplótipos e mudanças na estrutura das populações. Assim, poderemos detectar possíveis declínios em sua diversidade genética e tomar medidas imediatas impedindo que seu patrimônio genético se depaupere.

Determinar os locais que as espécies ameaçadas devem ser manejadas e conservadas é uma das questões mais importantes da biologia da conservação. Nesta perspectiva, a informação genética, sempre combinada com aspectos ecológicos e

informações biológicas podem fornecer informações extremamente úteis para o manejo e conservação (MAMURIS et al., 2005).

Neste caso em específico, sugerimos que novos trabalhos sejam realizados com objetivo de determinar os limites geográficos desta população, incluindo pesquisas com a marcação de exemplares.

É importante salientar que *Brycon nattereri* é uma espécie de ocorrência quase exclusiva em regiões de cabeceira das bacias hidrográficas, estes ambientes se caracterizam por possuírem um número significativo de corredeiras que mantêm as águas bem oxigenadas. A construção de barramentos ao longo do rio, e a consequente destruição destes habitats pode tornar a ocorrência destas espécies cada vez mais restrita a um número ainda menor de corpos d'água. Portanto, estes empreendimentos representam uma ameaça muito significativa.

5 CONCLUSÕES

A diversidade genética de *Brycon nattereri* ficou surpreendentemente acima do esperado, principalmente por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção e isolada em uma porção do rio. Ainda existe uma quantidade relativa de diversidade no genoma mitocondrial, e uma quantidade satisfatória, dentro dos limites encontrados para o gênero *Brycon*, para os marcadores de microssatélite. Estes dados revelam a existência de diversidade genética nesta população, e esforços para sua proteção podem trazer bons resultados.

Devido às características biológicas da espécie, tais como sensibilidade a qualidade da água e sua dependência de recursos alóctones, entendemos que a pirapitinga é uma forte candidata à espécie bandeira para conservação não apenas do rio Laranjinha, mas de todas as suas matas ciliares. Acreditamos que as populações podem se recuperar e expandir sua área de ocorrência naturalmente, desde que esforços sejam empregados na recomposição de matas e melhoria da qualidade da água.

Este trabalho e todas as medidas de preservação e recuperação propostas vão de encontro às estratégias traçadas pelo próprio Ministério do Meio Ambiente (ROSA; LIMA, 2008).

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária pelo financiamento do projeto, UENP e UEL pela infraestrutura laboratorial e logística de coleta, Agradecemos ao Prof. Dr. Oscar A. Shibatta pela identificação dos exemplares, à Klabin por permitir a coleta no distrito da Moquéim (Ventania – PR), à bióloga Ms. Karen M. Suzuki pelo auxílio no sequenciamento das amostras e a todos os estagiários e técnicos do GECON e LAGEA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. M.; PEREIRA, L. H. G.; VILA, V. B.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguayan River Basin. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p. 868-873: 2009
- 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, **Brazilian Journal of Zoology**, v. 253, p. 113-120: 2001
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p. 403-410: 1990
- ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia Molecular e Evolução** (Eds.). 2ª Ed. Ribeirão Preto. Editora Holos / Sociedade Brasileira de Genética: 2012
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37 - 48: 1999
- BARBOSA, A. C. D. R.; GALZERANI, F.; CORRÊA, T. C.; GALETTI JR, P. M.; HATANAKA, T. Description of novel microsatellite *loci* in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, 1 (suppl), p. 357-360: 2008
- BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. **Aquaculture**, v. 247, p. 51-65: 2005
- BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. M.; GUIMARÃES, S. E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Identification and characterization of microsatellites *loci* in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 297-298: 2003
- BELEI, F.; SAMPAIO, W. M. S. Ictiofauna do rio Lourenço Velho, afluente do rio Grande: pequena diversidade, grande importância para a conservação de uma espécie ameaçada. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 3, n. 1, p. 28 - 31: 2012
- BIRKY JR, C. W.; MARUYAMA, T.; FUERST, P. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. **Genetics**, v. 103, p. 513-527: 1983
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. (eds.). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro, Museu Nacional. 195p. (Série Livros, 23): 2007

CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DeSALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 245 – 247: 2001

CASARIM, R.; BUENO, M. L.; POMPEU, P. S. Ichthyofauna of the Aiuruoca River basin, Minas Gerais, Brazil. **Check List**, v.8, p. 1166 – 1171: 2012

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014: 1996

CRONIN, M. A.; SPEARMAN, W. J. ; WILMOT, R. L.; PATTON, J. C.; BICKHAM, J. W. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O.keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 50, p. 708-715: 1993

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

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p. 564-567: 2010

FERREIRA, D. G. Análise genética da espécie Neotropical *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes: Cichlidae). Dissertação apresentada ao curso 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. 2013

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. J. D.; BRISCOE, D. D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. 2ª ed. Cambridge University Press, 618 p: 2010

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons Ltd, England: 2005

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

GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines e anchovies and lessons for conservation. **The Journal of Heredity**. v.89, n.5, p.415-426: 1998

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98: 1999

HILSDORF, A. W. S.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; KRIEGER, M. H.; KRIEGER. Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus*(Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. **Aquaculture**, v. 214, p. 81 – 91: 2002

IERVOLINO, F.; RESENDE, E. K. HILSDORF, A. W. S. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. **Fisheries Research**, v.101, p. 27–31: 2010

LAIKRE, L.; LARSSON, L. C.; PALMÉ, A.; CHARLIER, J.; JOSEFSSON, M.; RYMAN, N. Potentials for monitoring gene level biodiversity: using Sweden as an example. **Biodiversity Conservation**, v.17, p. 893–910: 2008

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p.1451-1452: 2009

LIMA, F. C. T.; ALBRECHT, M. P.; PAVANELLI, C. S.; VONO, V. Threatened fishes of the world: *Brycon nattereri* Günther, 1864 (Characidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 83, p. 207 – 208: 2008

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In REIS. R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre (RS). EDIPUCRS. 742p: 2003

LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; MANGOLIN, C. A. Caracterização genética de *Brycon orbignyanus* utilizando o sistema seminatural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 184-191: 2010

LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciencia y Investigación Agraria**, v. 36, p. 191-208: 2009

LÓPEZ, L. Genetic variability and population structure of dorada (*Brycon moorei sinuensis* Dahl) in the Sinú River, Córdoba, Colombia. **Lakes and Reservoirs: Research and Management**, v.11, p. 1 – 7: 2006

LOWE, T. M.; EDDY, S. R. "tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence". **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 955 - 964: 1997

MAMURIS, Z.; STOUMBOUDI, M. T.; STAMATIS, C.; BARBIERI, R.; MOUTOU, K. A. Genetic variation in populations of the endangered fish *Ladigesocypris ghigiand* its implications for conservation. **Freshwater Biology**, v. 50, p. 1441–1453: 2005

MARSHALL, T. **Program Cervus (ver 3.0.3)**. Field Genetics Ltd. www.fieldgenetics.com: 1998

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

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

MCCUSKER, M. R.; BENTZEN, P. Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes. **Molecular Ecology**, v.19, p. 4852 – 4862: 2010

MEYER, A.; KOCHER, T. D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A. C. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**, v.347, p. 550-553: 1990

MIKICH, S.B.; BÉRNILS, R.S. **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná**. Acessado em > <http://www.pr.gov.br/iap>. Capturado em 27 dez 2012: 2004

MORELLI, K. A.; REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 32–34: 2007

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4ª Ed. Editora John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA: 2006

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 347–354: 1995

PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; JULIO JR, H. F.; AGOSTINHO, C. S.; PRIOLI, L. M. Molecular variability in *Brycon cf. pesu* Müller and Troschel, 1845 (Characiformes: Characidae) from the Araguaia-Tocantins basin. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 95-106: 2008

PAVANELLI, C. S.; GRAÇA, W. J.; ZAWADZKI, C. H.; BRITSKI, H. A.; VIDOTTI, A. P.; AVELINO, G. S.; VERÍSSIMO, S. Fishes from the Corumbá Reservoir, Paranaíba River drainage, upper Paraná River basin, State of Goiás, Brazil. **Check List**, v. 3, p. 58 – 64: 2007

POMPEU, P. S.; REIS, L. S.; GANDINI, C. V.; SOUZA, R. C.R.; FAVERO, J. M. The ichthyofauna of upper rio Capivari: defining conservation strategies based on the composition and distribution of fish species. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, p. 659 - 666: 2009

PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO JR, H. F.; PAVANELLI, C. S.; OLIVERIA, 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. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 421-430: 2002.

RAMOS, J. V. B.; SODRÉ, L. M. K.; ORSI, M. L.; ALMEIDA, F. S. Genetic diversity of the species *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes) in the Canoas Complex - Paranapanema River. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 821 – 828: 2012

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

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225: 1989

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; SIROL, R. N.; JACOMETO, C. B. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 56-63: 2010

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção.in: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1ª Ed. MMA (Brasília, DF), Fundação Biodiversitas (Belo Horizonte, MG): 2008

ROUSSET, F. GENEPOP'007: a complete re-implementation the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106: 2008

RUEDA, E. C.; SOMMER, J.; SCARABOTTI, P.; MARKARIANI, R.; ORTÍ, G. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite *loci* in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, p. 681 – 684: 2011

SABINO, J.; ANDRADE, L. P. Uso e conservação da ictiofauna no ecoturismo da região de Bonito, Mato Grosso do Sul: o mito da sustentabilidade ecológica no rio baía bonita (Aquário Natural de Bonito). **Biota Neotropica**, v. 3, p. 1 – 9: 2003

SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 889-895: 2007

SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p. 1045-1046: : 2006

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 33 –44: 2007

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234: 2000

SHIBATTA, O. A.; GEALH, A. M.; BENNEMANN, S. T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 125 – 134: 2007

- SIMIC, V.; SIMIC, S.; PAUNOVIC, M.; CAKIC, P. Model of the assessment of the critical risk of extinction and the priorities of protection of endangered aquatic species at the national level. **Biodiversity Conservation**, v. 16, p. 2471–2493: 2007
- STRECKER, U. Polymorphic microsatellites isolated from the cave fish *Astyanax fasciatus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 150 – 151: 2003
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680: 1994
- TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. **1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology** - Ribeirão Preto: 2003
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. F. (2004). Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538: 2004
- VIANA, D.; ZAWADZKI, C. H.; OLIVEIRA, E. F. D.; VOGEL, H. F.; GRACA, W. J. D. Estrutura da ictiofauna do rio Bonito, bacia hidrografica do rio Ivai, sistema alto rio Parana, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 2, p. 218-226: 2013
- VIANNA, N. C.; NOGUEIRA, M. G. Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 20, p. 139-151: 2008
- VIEIRA, F.; SANTOS, G. B.; ALVES, C. B. M. A ictiofauna do Parque Nacional da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil) e áreas adjacentes. **Lundiana**, v.6 (supplement), p. 77-87: 2005
- WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, **University of Agricultural Sciences**, Vienna: 1999. Disponível em <http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>
- WAITS, L.; TALBOT, S. L.; WARD, R. H.; SHIELDS, G. F. Mitochondrial DNA phylogeography of the north American Brown Bear and implications for conservation. **Conservation Biology**, v. 12, p. 408 – 417: 1998
- WARD, R. D. Genetics of Fish Populations. Cap. 9. in: HART, P. J. B.; REYNOLDS, J. D. **Handbook of Fish Biology and Fisheries**, v. 1 **Fish biology**. Blackwell Publishing company – USA: 2002
- WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 20, p. 48 -52: 2004

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

WEIR, B. S. (ed.) **Genetic Data Analysis II**. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA: 1996

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T.J.; XIYAN, J. M. Pop Gene 32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v.1.32. **Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta**, Edmonton, Alberta, Canada, 2000.

5 CONCLUSÕES GERAIS

- O rio Laranjinha possui uma ictiofauna muito rica, nela podemos destacar:
 - Grande quantidade de espécies migradoras;
 - Espécies ameaçadas de extinção no estado do Paraná e no Brasil;
 - Espécies novas para ciência
- O rio Laranjinha apresenta diversidade genética satisfatória nas três espécies estudadas, abrigando linhagens mitocondriais diversas, haplótipos exclusivos e alelos privados;
- O rio Laranjinha recebe peixes migradores da represa de Capivara, ao menos parte das populações de peixes migradores encontrados na represa de capivara utiliza o rio Laranjinha em algum estágio do ciclo de vida;
- Por todos estes motivos o rio Laranjinha comprovou ser fundamental para manutenção da diversidade de peixes da região do médio rio Paranapanema, qualquer decisão que envolva sua preservação, gestão ou manejo deveria levar em conta os dados apresentados no presente estudo;
- Atualmente o GECON (Laboratório de Genética e Conservação) da UENP conta um banco de amostras de DNA da maioria espécies coletadas ao longo do rio Laranjinha que pode servir como base de comparação para futuros estudos de monitoramento da riqueza de espécies e diversidade genética das espécies presentes no rio Laranjinha.
- O rio Laranjinha não deve ser considerado para a construção de futuros barramentos para quaisquer finalidade, levando em conta o risco à diversidade de peixes alí presente;

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELL, R. Conservation Biology for the Biodiversity Crisis: A Freshwater Follow-up. **Conservation Biology**. v.16, n. 5, p. 1435 – 1437: 2002.

ABREU, M. M.; PEREIRA, L. H. G.; VILA, V. B.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p. 868-873: 2009

AGOSTINHO, A. A.; AGOSTINHO, C. S.; PELICICE, F. M.; MARQUES, E. E. Fish ladders: safe fish passage or hotspot for predation?. **Neotropical Ichthyology**, v. 10. N. 4, p. 687-696: 2012

AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian Journal of Biology**. v. 68(4, Suppl.), p. 1119-1132: 2008

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Eduem – Maringá, 501p.: 2007

AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; PETRY, A. C.; GOMES, L. C.; JÚLIO JR, H. F. Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health & Management**. v. 10(2), p.174–186: 2007a

AGOSTINHO, A. A.; MARQUES, E. E.; AGOSTINHO, C. S.; ALMEIDA, D. A.; OLIVEIRA, R. J.; MELO, J. R. B. Fish ladder of Lajeado Dam: migrations on one-way routes? **Neotropical Ichthyology**, v.5 n. 2, p.121-130: 2007b

AGOSTINHO, C. S.; AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F.; ALMEIDA, D. A. D.; MARQUES, E. E. Selectivity of fish ladders: a bottleneck in Neotropical fish movement. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 205-213: 2007c

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p. 70-78: 2005

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 646-652: 2005

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. **Ecologia de Reservatório: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. Ed. Rima, São Carlos – SP, p. 23-55: 2005

AGOSTINHO, A. A. Pesquisas, monitoramento e manejo da fauna aquática em empreendimentos hidrelétricos. **Seminários sobre fauna aquática eo setor elétrico brasileiro**, v. 1, p. 38-61: 1994

AGUIRRE-PABÓN, J.; BARANDICA, J. N.; GARCÍA, L. C. Mitochondrial DNA variation of the bocachico *Prochilodus magdalenae* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Magdalena River Basin, Colombia. **Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems**: 2013

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Blackwell Publishing: 2007

ALMEIDA, F. S. D.; LOPES, C. M.; ORSI, M. L.; SIROL, R. N.; SODRÉ, L. M. K. Genetic monitoring by rapd markers for repopulation programs of *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characiformes). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 35, n. 2, p. 119-126: 2013

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica. **Relatório de Acompanhamento de Estudos e Projetos de Usinas Hidrelétricas** de 18/10/2013. Site: <http://www.aneel.gov.br/area.cfm?idArea=428>. Acessado em 22/10/2013: 2013

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica. **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 3ª Edição. Brasil: 2008

ANTONIO, R. R.; AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; BAILLY, D.; OKADA, E. K.; DIAS, J. H. P. Blockage of migration routes by dam construction: can migratory fish find alternative routes? **Neotropical Ichthyology**. v. 5, n. 2, p.177-184: 2007

ARCIFA, M. S.; ESGUÍCERO, A. L. H. The fish fauna in the fish passage at the Ourinhos Dam, Paranapanema River. *Neotropical Ichthyology*, v. 10, n. 4, p. 715-722: 2012

ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia Molecular e Evolução** (Eds.). 2ª Ed. Ribeirão Preto. Editora Holos / Sociedade Brasileira de Genética: 2012

ASHIKAGA, F. Y. Estudo da estrutura genética de *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) das escadas para transposição de peixes do complexo Canoas – Rio Paranapanema. Dissertação apresentada ao curso 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. 2008

AZEVEDO-SANTOS, V. M. D.; RIGOLIN-SÁ, O.; PELICICE, F. M. Growing, losing or introducing? Cage aquaculture as a vector for the introduction of non-native fish in Furnas Reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 4, p. 915-919: 2011

BALIAN, E. V.; SEGERS, H.; LÉVÊQUE, C.; MARTENS, K. The Freshwater Animal Diversity Assessment: an overview of the results. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 627–637: 2008

BARBOSA, A. C. D. R.; GALZERANI, F.; CORRÊA, T. C.; GALETTI JR, P. M.; HATANAKA, T. Description of novel microsatellite *loci* in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, 1 (suppl), p. 357-360: 2008

BARBOSA, A. C.; CORREA, T. C.; GALZERANI, F.; GALETTI, P. M.; HATANAKA, T. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 3, p. 936-938: 2006

BARLETTA, M.; JAUREGUIZAR, A. J.; BAIGUN, C.; FONTOURA, N. F.; AGOSTINHO, A. A.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; TORRES, R. A.; JIMENES-SEGURA, L. F.; GIARRIZZO, T.; FABR´E, N. N.; BATISTA, V. S.; LASSO, C.; TAPHORN, D. C.; COSTA, M. F.; CHAVES, P. T.; VIEIRA, J. P.; CORRÊA, M. F. M. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. **Journal of Fish Biology**, n.76, p. 2118 – 2176: 2010

BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. **Aquaculture**, v. 247, p. 51–65: 2005

BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. M.; GUIMARˆES, S. E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 297-298: 2003

BATISTA, J. S.; FARIAS, I. P.; FORMIGA-AQUINO, K.; SOUSA, A. C. B.; ALVES-GOMES, J. A. DNA microsatellite markers for “dourada”(*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. **Conservation Genetics Resources**, v. 2, n. 1, p. 5-10: 2010

BERGKAMP, G.; MCCARTNEY, M.; DUGAN, P.; MCNEELY, J.; ACREMAN, M. Dams, ecosystem functions and environmental restoration. **Thematic Review II**, 1: 2000

BIG – ANEEL. Banco de Informações de Geração. Site: <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.cfm> - acessado em 24/10/2013 às 10h41: 2013

BILLINGTON, N.; HEBERT, P. D. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48(S1), p. 80-94: 1991

BJÖRKLUND, M. A method for adjusting allele frequencies in the case of microsatellite allele drop-out. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 676–679: 2005

BRASIL, **Boletim estatístico de pesca e aquicultura: Brasil, 2010**. Ministério da Pesca e Aquicultura. Brasília (DF): 2012

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. (eds.). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro, Museu Nacional. 195p. (Série Livros, 23): 2007

CALCAGNOTTO, D.; DESALLE, R. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 607-616: 2009

CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DeSALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 245 – 247: 2001

CARRILLO-AVILA, M.; RESENDE, E. K.; MARQUES, D. K.; GALETTI JR, P. M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish Jaú, *Zungaro jahu* (Siluriformes, Pimelodidae). **Conservation Genetics**, v. 10, n. 5, p. 1597-1599: 2009

CARVALHO, D. C.; SEERIG, A. S.; BRASIL, B. S. A. F.; CREPALDI, D. V.; OLIVEIRA, D. A. A. Molecular identification of the hybrid between the catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* using a set of eight microsatellite markers. **Journal of fish biology**, v. 83, n. 3, p. 671-676: 2013

CARVALHO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; SAMPAIO, I.; BEHEREGARAY, L. B. Microsatellite markers for the Amazon peacock bass (*Cichla piquiti*). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 239-241: 2009

CARVALHO-COSTA, L. F., HATANAKA, T., & GALETTI JR, P. M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 377-380: 2008

CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; GALETTI, P. M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 3, p. 818-819: 2006

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Family Prochilodontidae (Flannel mouth characiforms). In REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre (RS). EDIPUCRS. 742p: 2003

COSTA, A. D. A; FERREIRA, D. G.; SILVA, W. F.; ZANATTA, A. S.; SHIBATTA, O. A.; GALINDO, B. A. Fishes (Osteichthyes: Actinopterygii) from the Penacho stream, upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. **Check List**, v. 9(3), p. 519–523: 2013

COSTA, A. D. A. **Ictiofauna da microbacia do córrego Água das Araras, bacia do rio Laranjinha, alto rio Paraná, PR – Brasil**. Artigo apresentado como requisito obrigatório para a obtenção do título de Especialista em Conservação com ênfase em fragmentação. Orientador: Prof. Bruno A. Galindo. UENP – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Cornélio Procópio: 2013b

COMPANHIA BRASILEIRA DE ALUMÍNIO. Disponível em: <http://www.cba.ind.br/pt/usinas.php>. Acessado em: 05 de dezembro de 2013

CRUZEIRO DO SUL. Consórcio Energético Cruzeiro do Sul – UHE Mauá. Site: <http://www.usinamaua.com.br/> - acessado em 22/10/2013 às 11:01h: 2013

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

DIAS, J. H.; BRITTO, S. G. C.; VIANNA, N. C.; GARAVELLO, J. C. Biological and ecological aspects of *Pinirampus pirinampu* (Spix, 1829), Siluriformes, Pimelodidae, in Capivara reservoir, Paranapanema River, Southern Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**. v.16, n. 3, p. 293-304: 2004

DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A. H.; GESSNER, M. O.; KAWABATA, Z. I.; KNOWLER, D. J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R. J.; PRIEUR-RICHARD, A. H.; SOTO, D.; STIASSNY, M. L. J.; SULLIVAN, C. A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews**, v. 81, p. 163–182: 2006

EXCOFFIER, L.; HECKEL, G. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 10, p. 745-758: 2006

FERREIRA, M. G.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN. Brasília: 1995

FERREIRA, D. G.; GALINDO, B. A.; ALVES, A. N.; ALMEIDA, F. S.; RUAS, C. F.; SOFIA, S. H. Development and characterization of 14 microsatellite loci in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). **Journal of fish biology**, v. 83, n. 5, p. 1430-1438: 2013

FERREIRA, D. G. Análise genética da espécie Neotropical *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes: Cichlidae). Dissertação apresentada ao curso 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. 2013

FISCHER, C.; KOBLMÜLLER, S.; GÜLLY, C.; SCHLÖTTERER, C.; STURMBAUER, C.; THALLINGER, G. G. Complete Mitochondrial DNA Sequences of the Threadfin Cichlid (*Petrochromis trewavasae*) and the Blunthead Cichlid (*Tropheus moorii*) and Patterns of Mitochondrial Genome Evolution in Cichlid Fishes. **PLoS ONE**. v. 8, n. 6: e67048.doi:10.1371/journal.pone.0067048: 2013

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. J. D.; BRISCOE, D. D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. 2ª ed. Cambridge University Press, 618 p: 2010

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons Ltd, England: 2005

FUTUYAMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2ª Ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP: 1992

GALVES, W.; SHIBATTA, O. A.; JEREP, F. C. Estudos sobre diversidade de peixes da bacia do alto rio Paraná: uma revisão histórica. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.30, n. 2, p.141-154: 2009

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

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

GONDIM, S. G. C. A.; RESENDE, L. V.; BRONDANI, R. P. V.; COLLEVATTI, R. G.; SILVA-JÚNIOR, N. J.; PEREIRA, R. R.; TELLES, M. P. C. Development of microsatellite markers for *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1513-1517: 2010

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Editora EDUEM. Maringá – PR. 241p: 2007

HAMOY, I. G.; CIDADE, F. W.; BARBOSA, M. S.; GONÇALVES, E. C.; SANTOS, S. Isolation and characterization of tri and tetranucleotide microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 1, p. 33-36: 2011

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª Ed, Editora Artmed. Porto Alegre, RS: 2010

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JR, P. M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v. 126 (1-2), p.153-159: 2006

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

HICKMAN JR, C. P.; ROBERTS, L. S.; KEEN, S. L.; EISENHOUR, D. J.; LARSON, A.; I'ANSON, H. **Princípios Integrados de Zoologia**. 15ª Edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ: 2013

HILSDORF, A. W. S.; KRIEGER, J. E. Restriction site heteroplasmy in the mitochondrial DNA of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819)(Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 37, n. 3, p. 307-310: 2004

HILSDORF, A. W. S.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; KRIEGER, M. H.; KRIEGER. Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus*(Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. **Aquaculture**, v. 214, p. 81 – 91: 2002

HOFFMANN, A. C.; ORSI, M. L.; SHIBATTA, O. A. Diversidade de peixes do reservatório da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná, Brasil, ea importância dos grandes tributários na sua manutenção. **Iheringia, Série Zoológica**, v. 95, n. 3, p. 319-325: 2005

HOLLANDA CARVALHO, P. Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae). Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Biologia-Genética. 2011

IERVOLINO, F.; RESENDE, E. K. HILSDORF, A. W. S. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. **Fisheries Research**, v.101, p. 27–31: 2010

LANGANI, F.; CASTRO, R. M. C.; OYAKAWA, O. T.; SHIBATTA, O. A.; PAVANELLI, C. S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 1-17: 2007

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

LEUZZI, M. S. P.; DE ALMEIDA, F. S.; ORSI, M. L.; SODRÉ, L. M. K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 355 - 362: 2004

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In REIS. R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre (RS). EDIPUCRS. 742p: 2003

LOPES, T. D. S.; RIBEIRO, R. P.; BARRERO, N. M. L.; SIROL, R. N.; POVH, J. A.; GOMES, P. C.; VARGAS, L. Caracterização genética de estoques de curimba (" *Prochilodus lineatus*") utilizados em programas de repovoamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. , p. 652 - 661: 2008

- LOPES, C. M.; ALMEIDA, F. S. D.; ORSI, M. L.; BRITTO, S. G. D. C.; SIROL, R. N.; SODRÉ, L. M. K. Fish passage ladders from Canoas Complex- Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis*(Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 131-138: 2007
- LÓPEZ, L. Genetic variability and population structure of dorada (*Brycon moorei sinuensis* Dahl) in the Sinú River, Córdoba, Colombia. **Lakes and Reservoirs: Research and Management**, v.11, p. 1 – 7: 2006
- LORENZEN, K.; BEVERIDGE, M.; MANGEL, M. Cultured fish: integrative biology and management of domestication and interactions with wild fish. **Biological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 639-660: 2012
- MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p. 33-38: 2003
- MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia Molecular e Evolução** (Eds.). 2ª Ed. Ribeirão Preto. Editora Holos / Sociedade Brasileira de Genética: 2012
- MATSUMOTO, C. K.; HILSDORF, A. W. S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, p. 395-402: 2009
- MCCUSKER, M. R.; BENTZEN, P. Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes. **Molecular Ecology**, v.19, p. 4852 – 4862: 2010
- MELO, B. F.; SATO, Y.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. The roles of marginal lagoons in the maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *P. costatus*. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 625-636: 2013
- MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1855 –1867: 2003
- MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 521-526: 2007
- MORELLI, K. A.; REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 32–34: 2007
- MOYSÉS, C. B.; MOCKFORD, S.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; WRIGHT, J. M. Nine polymorphic microsatellite loci in the Neotropical electric eel *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 7-9: 2005

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4ª Ed. Editora John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA: 2006

NILSSON, C.; REIDY, C. A.; DYNESIUS, M.; REVENGA, C. Fragmentation and flow regulation of the world's large river systems. **Science**, v. 308(5720), p. 405-408: 2005

LEHNER, B.; R-LIERMANN, C.; REVENGA, C.; VÖRÖSMARTY, C.; FEKETE, B.; CROUZET, P.; DÖLL, P. High resolution mapping of the world's reservoirs and dams for sustainable river flow management. **Frontiers in Ecology and the Environment**. **Source: GWSP Digital Water Atlas**. Map 81: GRanD Database v. 1. (2008). Site: <http://atlas.gwsp.org>. Acessado em 13 de janeiro de 2014

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 81-100: 2009

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307: 2006

ORSI, M. L. **Estratégias reprodutivas de peixes da região média-baixa do rio Paranapanema, reservatório de Capivara**. Editora Edgard Blucher. São Paulo – SP: 2010

ORTÍ, G.; SIVASUNDAR, A.; DIETZ, K.; JÉGU, M. Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 343 – 351: 2008

PADHI, A. Genetic evidence of multiple matrilineal lineages of the channel catfish, *Ictalurus punctatus* in North America. **Conservation Genetics**: 2013a. DOI 10.1007/s10592-013-0479-6

PADHI, A. Contrasting patterns of genetic diversity between the northern and southern populations of yellow bullhead catfish, *Ameiurus natalis* in North America. **Aquatic Ecology**: 2013b. DOI 10.1007/s10452-013-9449-9

PAIVA, A. L. B.; KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). **Molecular ecology resources**, v. 8, n. 5, p. 1078-1080: 2008

PAIVA, S. D.; RENESTO, E.; ZAWADZKI, C. H. Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 370-375: 2005

PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; JULIO JR, H. F.; AGOSTINHO, C. S.; PRIOLI, L. M. Molecular variability in *Brycon cf. pesu* Müller and Troschel, 1845 (Characiformes: Characidae) from the Araguaia-Tocantins basin. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 95-106: 2008

- PAULA, F. M. Diversidade genética de *Prochilodus Lineatus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do Complexo Canoas - Rio Paranapanema. Dissertação apresentada ao curso 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. 2006
- PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, A. A. Fish-Passage Facilities as Ecological Traps in Large Neotropical Rivers. **Conservation Biology**, v. 22, n. 1, p. 180–188: 2008
- PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, n. 2, p. 215-225: 2009
- PETREIRE JR, M. Fisheries in large tropical reservoirs in South America. **Lakes & Reservoirs: Research & Management**, v. 2, (1-2), p. 111-133: 1996
- POMPEU, P. S.; SUZUKI, F. M.; PRADO, I.; SOUZA, R. C. Downstream fish passage: a bottleneck in neotropical migratory fish conservation. In: HELMUT MADER, H; KRAML, J. (eds). **9th International Symposium on Ecohydraulics 2012 Proceedings**: 2012
- PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P. D.; GALETTI JR, P. M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 1039-1050: 2008
- POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; STREIT JÚNIOR, D. P.; LOPERA BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; GOMES, P. C.; LOPES, T. D. S. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 2, p. 201-206: 2008
- PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO JR, H. F.; PAVANELLI, C. S.; OLIVERIA, 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. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 421-430: 2002.
- RAIO, C. B.; BENNEMANN, S. T. A ictiofauna da bacia do rio Tibagi eo projeto de construção da UHE Mauá, Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 31, n. 1, p. 15-20: 2010
- RAMOS, J. V. B.; SODRÉ, L. M. K.; ORSI, M. L.; ALMEIDA, F. S. Genetic diversity of the species *Leporinus elongates* (Teleostei: Characiformes) in the Canoas Complex - Paranapanema River. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 821 – 828: 2012
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre (RS). EDIPUCRS. 742p: 2003

RENESTO, E.; ZAWADZKI, C. H.; DE PAIVA, S. Allozyme differentiation and relationships within *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the upper Paraguay River basin, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 869-876: 2007

REVALDAVES, E.; PEREIRA, L. H.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v.5. n. 3, p. 463-465: 2005

REVALDAVES, E.; RENESETO, E.; MACHADO, M. F. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3: 1997

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; SIROL, R. N.; JACOMETO, C. B. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 56-63: 2010

RODRIGUES, F. C.; FARIAS, I. P.; BATISTA, J. S.; ALVES-GOMES, J. Isolation and characterization of microsatellites loci for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. **Conservation Genetics Resources**, v.1, n. 1, p. 365-368: 2009

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção.in: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1ª Ed. MMA (Brasília, DF), Fundação Biodiversitas (Belo Horizonte, MG): 2008

ROSSINI, B. C.; NUNES, A. G.; FREITAS, P. D.; GALETTI, P. Isolation and characterization of microsatellite loci of the freshwater fish *Salminus franciscanus*. **Molecular Ecology Resources**: 2010

RUEDA, E. C.; CARRIQUIRIBORDE, P.; MONZÓN, A. M.; SOMOZA, G. M.; ORTÍ, G. Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. **Genetica**, v. 141(7-9), p. 401-407: 2013

RUEDA, E. C.; SOMMER, J.; SCARABOTTI, P.; MARKARIANI, R.; ORTÍ, G. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, p. 681 – 684: 2011

RUEDA, E. C.; AMAVET, P.; BRANCOLINI, F.; SOMMER, J.; ORTÍ, G. Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite markers for the migratory characiform fish, *Salminus brasiliensis*. **Journal of fish biology**, v. 79, n. 5, p. 1370-1375: 2011b

SABINO, J.; ANDRADE, L. P. Uso e conservação da ictiofauna no ecoturismo da região de Bonito, Mato Grosso do Sul: o mito da sustentabilidade ecológica no rio baía bonita (Aquário Natural de Bonito). **Biota Neotropica**, v. 3, p. 1 – 9: 2003

SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 889-895: 2007

SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p. 1045-1046: : 2006

SANTA CRUZ GERAÇÃO DE ENERGIA. Disponível em: http://www.santacruzgeracao.com.br/geral/uhe_paranapanema.htm. Acesso em: 05 de dezembro de 2013.

SANTA HELENA ENERGIA. EIA – Estudo de Impacto Ambiental, PCH Foz da Anta. A. Muller Consultoria Ambiental. Disponível em: <http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=646>. Acesso em: 09 de dezembro de 2013.

SANTOS, M. D. C. F.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. **Molecular ecology resources**, v. 9, n. 3, p. 874-876: 2009

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 33 –44: 2007

SANTOS, L. J. C.; OKA-FIORI, C.; CANALI, N. E.; FIORI, A. P.; SILVEIRA, C. T.; SILVA, J. M. F.; ROSS, J. L. S. Mapeamento geomorfológico do estado do Paraná. **Revista Brasileira de Geomorfologia**, n. 2: 2006

SAULO-MACHADO, A. C.; FORMIGA, K. M.; ORTIZ, M. F.; SOUSA, A. C. B.; ALVES-GOMES, J. A.; BATISTA, J. S. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 2, p. 307-310: 2011

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 1, p. 63-69: 2004

SCHWARTZ, W. Meio Ambiente Finalmente, a escada de peixes no Laranjinha Demorou sete anos para ficar pronta e será "inaugurada" na piracema que se aproxima. **Folha de Londrina**. Londrina, 27 out. 2006

SHIBATTA, O. A.; ORSI, M. L.; BENNEMANN, S. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina, Paraná: 2002

- SILVA, J. V.; HILSDORF, A. W. S. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). **Conservation Genetics Resources**, v.3, n. 3, p. 437-439: 2011
- SIMIC, V.; SIMIC, S.; PAUNOVIC, M.; CAKIC, P. Model of the assessment of the critical risk of extinction and the priorities of protection of endangered aquatic species at the national level. **Biodiversity Conservation**, v. 16, p. 2471–2493: 2007
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v.10, p. 407– 417: 2001
- SOFIA, S. H.; GALINDO, B. A.; PAULA, F. M.; SODRÉ, L. M. K.; MARTINEZ, C. B. R. Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p. 317-323 : 2008
- SOFIA, S. H.; SILVA, C. R.; GALINDO, B. A.; ALMEIDA, F. S.; SODRE, L. M.; MARTINEZ, C. B. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia*, v. 553, n. 1, p. 245-254: 2006
- SOLÉ-CAVA, A. M.; CUNHA, H. A. A genética e a conservação da natureza. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia Molecular e Evolução** (Eds.). 2ª Ed. Ribeirão Preto. Editora Holos / Sociedade Brasileira de Genética: 2012
- SOUZA-SHIBATTA, L.; FERREIRA, D. G.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA, F. S. D.; SHIBATTA, O. A.; SOFIA, S. H. Development and characterization of microsatellite loci of *Microglanis cottoides* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) and cross-species amplification. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 581-585: 2013
- STRECKER, U. Polymorphic microsatellites isolated from the cave fish *Astyanax fasciatus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 150 – 151: 2003
- TELLES, M. P. C.; RESENDE, L. V.; BRONDANI, R. P. V.; COLLEVATTI, R. G.; COSTA, M. C.; JÚNIOR, N. S. Isolation and characterization of microsatellite markers in the armored catfish *Hypostomus gymnorhynchus* (Loricariidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1770-1774: 2010
- VIANNA, N. C.; NOGUEIRA, M. G. Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 20, p. 139-151: 2008
- VÖRÖSMARTY, C. J.; LÉVÊQUE, C.; REVENGA, C.; BOS, R.; CAUDILL, C.; CHILTON, J.; DOUGLAS, E. M.; MEYBECK, M.; PRAGER, D.; BALVANERA, P.; BARKER, S.; MAAS, M.; NILSON, C.; OKI, T.; REIDY, C. A. Chapter 7 – fresh water in: SCHOLLES, H. R.; ASH, N. (eds). **Ecosystems and Human Well-being. Vol. 1. Current State and Trends**. Millennium Ecosystem Assessment. Island Press, Washington, p 165 -207: 2006

VRIJENHOEK, R. C. Conservation genetics of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v. 53, s. A, p. 394-412: 1998

WANG, C.; LIU, H.; LIU, Z.; WANG, J.; ZOU, J.; LI, X. Mitochondrial genetic diversity and gene flow of common carp from main river drainages in China. **Freshwater Biology**, v. 55, p. 1905 – 1915: 2010

WARD, R. D. Genetics of Fish Populations. Cap. 9. in: HART, P. J. B.; REYNOLDS, J. D. **Handbook of Fish Biology and Fisheries**, v. 1 **Fish biology**. Blackwell Publishing company – USA: 2002

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations**. v. 4. Chicago, IL, USA. University of Chicago press: 1978

YAZBECK, G. M.; KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 1026-1034: 2007.

YUE, G. H.; DAVID, L.; ORBAN, L. Mutation rate and pattern of microsatellites in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Genetica**, v. 129, n. 3, p. 329-331: 2007

ZAGANINI, R. L.; HASHIMOTO, D. T.; PEREIRA, L. H. G.; OLIVEIRA, C.; MENDONÇA, F. F.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. **Journal of Genetics**, v. 91, p. 24 – 27: 2012

ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; DE PAIVA, S.; LARA-KAMEI, M. C. Allozyme Differentiation of Four Populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a Small Stream in the Upper Rio Paraná Basin, Brazil. **Genetica**, v. 121, n. 3, p. 251-257: 2004

ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; DOS REIS, R. E.; MOURA, M. O.; MATEUS, R. P. Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genetica**, v. 123, n. 3, p. 271-283: 2005