



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WILSON FRANTINE DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE EMBRIÕES E LARVAS
DE PEIXES (TELEOSTEI: OSTEICHTHYES) DA BACIA DO
MÉDIO-BAIXO RIO PARANAPANEMA**

Londrina
2014



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agrônomo do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária

WILSON FRANTINE DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE EMBRIÕES E LARVAS
DE PEIXES (TELEOSTEI: OSTEICHTHYES) DA BACIA DO
MÉDIO-BAIXO RIO PARANAPANEMA**

WILSON FRANTINE DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE EMBRIÕES E LARVAS
DE PEIXES (TELEOSTEI: OSTEICHTHYES) DA BACIA DO
MÉDIO-BAIXO RIO PARANAPANEMA**

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

Orientadora: Dra. Fernanda S. de Almeida

Co-orientadora: Dra. Silvia Helena Sofia

Londrina
2014

S586i Silva, Wilson Frantine da.

Identificação molecular de embriões e larvas de peixes (Teleostei: Osteichthyes) da bacia do médio-baixo rio Paranapanema / Wilson Frantine da Silva. – Londrina, 2014. 102 f. : il.

Orientador: Fernanda Simões de Almeida.

Coorientador: Silvia Helena Sofia.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Peixe – Larva – Teses. 2. Peixe – Genética – Teses. 3. Biologia molecular – Teses. 4. Biodiversidade – Conservação – Teses. 5. Teleósteos – Teses. 6. Paranapanema, Rio, Bacia (SP e PR) – Teses. I. Almeida, Fernanda Simões de. II. Sofia, Silvia Helena. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônômico do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 597.5

WILSON FRANTINE DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE EMBRIÕES E LARVAS DE
PEIXES (TELEOSTEI: OSTEICHTHYES) DA BACIA DO MÉDIO-
BAIXO RIO PARANAPANEMA**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Karina Alessandra Morelli
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Dr. Cláudio de Oliveira
Universidade Estadual Paulista – UNESP/Botucatu

Londrina, 24 de fevereiro de 2014.

Aos que me precederam e aos que me
sucederão, pois a ciência e a vida de nada
servem se não forem partilhados.
Dedico este trabalho à minha família, em
especial aos meus pais Wilson e Lidileuza, que
nunca deixaram de acreditar que seria possível

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Claudio de Oliveira e à Dra. Karina Alessandra Morelli pela solicitude e prontidão em aceitar o convite para avaliar o presente trabalho.

Ao Dr. Mário Luis Orsi e ao Dr. Fernando Camargo Jerep por tão prontamente aceitarem compor a comissão de avaliação deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular pela estrutura física e humana, fornecidas ao longo destes dois anos.

À CAPES pela bolsa concedida e à DUKE ENERGY pelo importante auxílio financeiro para execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas pela avaliação crítica e contribuição dada a este trabalho, pela amizade e pelos inúmeros ensinamentos sobre genética e bioinformática, tão importantes para realização do presente estudo.

À minha mais que querida orientadora Dra. Fernanda Simões de Almeida que me presenteou com a oportunidade de realizar este trabalho e com a oportunidade de trabalhar ao seu lado. Presenteou-me ainda com seus conhecimentos, com sua companhia e exemplo de humanidade, mas principalmente com sua amizade, carinho e atenção a mim dirigidos ao longo destes dois últimos anos. Sinto-me orgulhoso e honrado de ter sido oficialmente seu primeiro orientado.

À minha co-orientadora Dra. Silvia Helena Sofia, por quem tenho grande estima, por sua amizade e exemplo diário de profissionalismo, ética e perseverança. Por ter me acolhido em seu laboratório em um momento em que muitos não o fariam, dando-me um dos maiores exemplos de nobreza de caráter que jamais tivera a oportunidade de presenciar. Obrigado por sua confiança.

Em especial ao amigo professor Dr. Mário Luis Orsi, que abriu as portas de seu laboratório e tão gentilmente me acolheu em meio à sua equipe, compartilhando não apenas inúmeros

conhecimentos sobre biologia de peixes, mas também incontáveis ensinamentos que levarei ao longo de minha vida.

À equipe do Laboratório de Ecologia de Peixes e Invasões Biológicas pelo auxílio, execução das coletas e no processamento do material biológico. Aos amigos do LEPiB, Diego Garcia, Alexandro Costa, Alexander Claro, Vitor Pimenta Abrahão, Edson Santana, Gean Leme, Marcelo Yabu e Karin Rocha de Almeida, com os quais tive maior contato ao longo destes dois anos. Caros amigos, sem vocês este trabalho não seria possível.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Ecologia Animal, Dhiego, Karen, Lenice e Douglas (os doutores primeiro), Rafael (Caconde), Alessandra, Cecília e Henrique (os mestres) e por fim, mas não menos importantes, Fer Midori, Thiago (Faustinho), Camila e Juliana Piva, que me deram o prazer e a honra de sua companhia nestes últimos dois anos. Muito obrigado a todos, primeiramente por me aguentarem, e por tão intensamente terem compartilhado momentos felizes, tristes, de estafa, mas principalmente de alegrias e risos. Cresci muito com todos vocês.

Ao amigo e eterno professor, Dr. Bruno Ambrozio Galindo, a quem devo minha iniciação acadêmica, com quem aprendi muito sobre Genética, mas principalmente o amor à biologia e à ciência.

Ao amigo Dhiego Gomes Ferreira, a quem muito estimo e agradeço de forma especial, pelo exemplo de profissionalismo, pelo auxílio e companheirismo diários de longa data, e pelas discussões sobre genética e evolução, que me deram tantos *insights* neste e outros trabalhos, o meu obrigado.

Aos amigos Carlos, Raul, Same, Renata, Mayara, Déia e Fabrício, Gazal e Carol, pela amizade e confiança em mim depositadas, pela companhia e apoio, e pelos momentos de descontração que sempre me serviram como fôlego para enfrentar todos os desafios que se

apresentavam. Vocês mais que minha gratidão terão sempre minha eterna amizade, pois o mal nunca dorme!

Agradeço em especial a meu pai Wilson, minha mãe Lidileuza e meus irmãos Michel e Marlino, que sempre se mantiveram unidos em todas as dificuldades pelas quais passamos me dando apoio e incentivo. Juntos vocês me ajudaram a provar, contra todas as probabilidades, que com amor e fé, não há objetivo que não possa ser alcançado. Sinto-me orgulhoso em poder chama-los de família.

Por fim, agradeço a Deus por ter me dado plenas condições de realizar tudo isso.

“O que mais me surpreende é o homem, pois vive como se nunca fosse morrer e morre como se nunca tivesse vivido”.

Dalai Lama

SILVA, Wilson Frantine. **Identificação molecular de embriões e larvas de peixes (Teleostei: Osteichthyes) da bacia do médio-baixo rio Paranapanema.** 2014. 102f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Ações antrópicas têm incidido fortes impactos sobre a ictiofauna, influenciando no sucesso reprodutivo destas espécies, e em muitos casos, comprometendo sustentabilidade das populações de peixes. Deste modo, avaliar quais espécies completa efetivamente o recrutamento populacional é imprescindível para traçar medidas de conservação eficazes. Uma das abordagens mais eficientes para avaliação do processo de recrutamento é quantificação e identificação de ovos e larvas, embora, a identificação de indivíduos em diferentes fases de desenvolvimento seja extremamente complexa. Neste contexto, objetiva-se com o presente estudo identificar os produtos reprodutivos de peixes (ovos e larvas) através do uso da metodologia *DNA barcoding*, relacionando os produtos reprodutivos com suas respectivas espécies no Rio Paranapanema, bacia do alto Rio Paraná. Amostragens foram realizadas ao longo do período de maior atividade reprodutiva dos peixes (outubro a fevereiro) entre os anos de 2012 e 2013, em diferentes pontos da bacia do médio rio Paranapanema. Análises de distância genética a partir de sequências do gene CO1 de aproximadamente 648pb possibilitaram a identificação de 99,81% das 536 amostras de ovos (293) e larvas (243) submetidas à análise, resultando em 37 espécies distribuídas em 27 gêneros, 15 famílias e quatro ordens. Os tributários da porção lótica do reservatório de Capivara mostraram a maior riqueza de espécies e densidade de ovos, bem como a maior frequência de espécies migradoras. A identificação molecular de ovos contribuiu com cerca de 30% da riqueza de espécies, além de indicar a existência de táxons restritos a este tipo de material. Os resultados apresentados demonstram a eficiência da abordagem *DNA barcoding* na identificação molecular do ictioplâncton, fornecendo informações precisas para programas manejo e conservação.

Palavras-chave: Ictioplâncton. *DNA barcoding*. mtDNA. Recrutamento.

SILVA, Wilson Frantine. **Molecular identification of fish embryos and larvae (Teleostei: Osteichthyes) of the middle-lower Paranapanema River Basin.** 2014. 102p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Human actions have focused strong impacts on fish, influencing the breeding success of these species and, in many cases, compromising sustainability of fish populations. Therefore, assess which species effectively complete the recruitment process is essential to outline effective conservation measures. The quantification and identification of Fish eggs and larvae is one of the most effective approaches for assessing the recruitment effectiveness, however, identification of individuals at different development stages is extremely complex. Thus, this study aim was to identify the fish eggs and larvae using DNA barcoding methodology, linking the early life stages with their respective species in Paranapanema River basin, upper Parana River basin. Samplings were made throughout the period of greatest fish reproductive activity (October to February), between 2012 and 2013, in different localities of the Middle-Lower Paranapanema River Basin. Genetic distances analysis from CO1 gene sequences, with approximately 648pb, allowed identification of 99.81% from 536 samples of eggs (293) and larvae (243) subjected to analysis, resulting in 37 species in 27 genera, 15 families and four orders. Tributaries in lotic portion of the Capivara reservoir showed the greatest species richness and egg density, as well the higher frequency of the migratory fish species. The molecular identification of eggs contributed about 30% of species richness, also to indicating the existence of taxa restricted to this type of material. The results here presented demonstrate the efficiency of DNA barcoding approach in molecular identification of ichthyoplankton, providing accurate information for management and conservation programs.

Keywords: Ichthyoplankton. DNA *barcoding*. mtDNA. Recruitment.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1 -** Distribuição do número de espécies de peixes descritas por região zoogeográfica. Adaptado de Lèvêque et al. (2008). NA, Região Neoartica; NT, Região Neotropical; PA, Região Palearctica; AT, Região Afrotropical; OL, Região Oriental, AU, Região Australasia 13
- Figura 2 -** Esquema hipotético de sucessão temporal de impactos causados após implantação de barramentos com ausência de impactos adicionais. De acordo com Petts (1984). 22
- Figura 3 -** Esquema de organização do genoma mitocondrial em peixes baseado na espécie *Larimichthys Crocea*. As posições relativas dos genes de RNA transportador estão indicadas pelas linhas transversais. Todos os genes codificadores de proteínas estão codificados na fita H com exceção do gene ND6. ND1-6, NADH desidrogenase subunidades 1-6 ; CO1-III , citocromo c oxidase subunidade I-III; ATP6 e ATP8 , ATPase subunidades 6 e 8 ; Cyt b, citocromo b; CR ,região controle. Adaptado de Cui et al. (2009). 31

CAPITULO 1

- Figura 1.1 -** Comparação da eficiência de amplificação do DNA mitocondrial e nuclear de ovos e larvas com diferentes marcadores e diferentes metodologias de extração..... 40
- Figura 1.2 -** Amplificação, sequenciamento e genotipagem de amostras de ovos e larvas de peixes. 1-Amplificação do gene CO1 (~680pb) visualizado em gel de agarose 1%; “A”- representa uma amostra com banda de maior intensidade e B representa uma amostra com banda de menor intensidade. 2- Eletroferograma de genotipagem dos primers P.mac 03, P.mac05, P.mac08 e P.mac11 (Paiva et al., 2008) e sequenciamento do gene CO1 com primer FishF1(Ward et al., 2005), (exibido apenas o final da sequência, ver apêndice-2), das mesmas amostras A e B apontadas no quadro1;..... 41

CAPITULO 2

- Figura 2.1 -** Distribuição dos pontos de coleta ao longo da porção média do rio Paranapanema. Pontos em amarelo demarcam os sítios de

amostragem: S1-Rio Taquara (23°30'48.49"S; 50°57'15.02"O); S2-Rio Apertados (23°23'28.05"S; 50°59'45.08"W); S3-Rio Congonhas (23°04'04.31"S; 50°51'32.56"); S4-médio Rio das Cinzas (23°4'33.31"S 50°21'47.22"O); S5- baixo Rio das Cinzas (22°57'12.12"S 50°31'40.24"O); S6-Canoas I (22°56'17.10"S; 50°17'21.32"O); S7-Canoas II (22°54'58.29"S 49°59'32.83"O). As linhas sólidas pretas demarcam as barragens das usinas hidroelétricas (UHEs) no rio Paranapanema, da esquerda para direita: UHE Capivara, UHE Canoas I, UHE Canoas II, UHE Salto Grande. 49

Figura 2.2 - Representação gráfica de distância genética K2P. Distância genética entre as sequências das 536 amostras estimada com base no modelo Kimura-2-Parâmetros agrupada pelo método Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através do software MEGA v5.0. Táxons marcados com um ponto preto correspondem a espécies migradoras segundo Agostinho et al. (2003); táxons com losango preto correspondem à espécie migradora ameaçada de extinção. Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada bifurcação, valores inferiores a 50% são ocultados. Os táxons terminais correspondentes a indivíduos da mesma espécie foram agrupados. Os nomes dos grupos em itálico indicam a correspondência ao menor nível taxonômico possível. 52

Figura 2.3 - Densidade e número de espécies das amostras de ovos e larvas por localidade ao longo do médio rio Paranapanema. A - densidade de ovos e larvas por 10m³ (Log10); B - número de espécies identificadas entre ovos e larvas em cada localidade. C - distribuição da densidade de ovos e larvas entre as ordens por localidade; D - frequência relativa de amostras analisadas por ordem; E - frequência relativa das amostras por ordem. 53

Figura 2.4 - Morfotipos de ovos e larvas definidos à priori. Quadros "A" (*S. nasutus*-PDCAI101), "B" (*Hoplías* sp.-PDCAI233) e "C" (*P. maculatus*-PDCAI105) três morfotipos de ovos encontrados; "D" *Incerte cedes*-PDCON07, "E" *L. friderici*-PDCAI144, "F" *H. intermedius*-PDCON33; "G" *E. trilineata*-PDCAI161, "H" *P. squamosissimus*-PDCAI146, e "I" *P. maculatus*-PDCAI158, correspondem aos morfotipos referentes às quatro ordens que puderam ser identificadas previamente, "E-F" Characiformes, "G" Gymnotiformes, "H" Perciformes, "I" Siluriformes, em seus estágios mais avançados em relação às amostras capturadas. 54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 -** Distribuição das frequências relativas das distâncias genéticas K2P intraespecíficas e interespecíficas. E.P. = erro padrão..... 51
- Tabela 2 -** Distribuição dos ovos e larvas de peixes identificados ao longo do médio rio Paranapanema. (%) frequência relativa; N- frequência absoluta; L – quantidade de larvas (frequência absoluta/densidade em 10m³); O – quantidade de ovos (frequência absoluta/densidade em 10m³). *espécie médio ou longo deslocamento reprodutivo (Agostinho et al., 2003). 55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	11
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1	DIVERSIDADE DE PEIXES E A REGIÃO NEOTROPICAL.....	12
3.2	ALTO RIO PARANÁ, RIO PARANAPANEMA E ICTIOFAUNA	14
3.3	ESTUDOS COM ICTIOPLÂNCTON NA BACIA DO ALTO RIO PARANÁ.....	16
3.4	BARRAGENS, SEUS IMPACTOS E O REFLEXO NA REPRODUÇÃO DE PEIXES	20
3.5	DIVERSIDADE, GENÉTICA E CONSERVAÇÃO	25
3.6	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	27
3.7	GENOMA MITOCONDRIAL E DNA <i>BARCODING</i>	30
4	CAPÍTULO 1 Protocolo rápido e econômico de extração de DNA para ictioplâncton	35
	RESUMO	35
	INTRODUÇÃO.....	36
	MATERIAL E MÉTODOS	37
	RESULTADOS	39
	DISCUSSÃO.....	42
	AGRADECIMENTOS	43
	REFERÊNCIAS	43
5	CAPÍTULO 2 Identificação molecular de embriões e larvas de peixes (Teleostei: Osteichthyes) do médio rio Paranapanema, bacia do alto Rio Paraná	45
	RESUMO	45
	INTRODUÇÃO.....	46
	MATERIAL E MÉTODOS	48
	RESULTADOS	51
	DISCUSSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS	66
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
7	APÊNDICES	73
	APÊNDICES 1 - Protocolo de preparo das soluções de trabalho.....	74
	APÊNDICES 2 - Eletroferograma completo de duas amostras utilizadas como exemplo no capítulo 1	75
	APÊNDICES 3 - Checklist, média dos resultados de similaridade e relação de distância para o táxon mais próximos	76

APÊNDICE 4 –	Árvore Neighbor Joining - K2P completa das 536 amostras de ovos e larvas do médio rio Paranapanema, representando a distribuição gráfica das distâncias genéticas	78
APÊNDICE 5 –	Sítios variáveis entre as sequências das 36 espécies identificadas.....	86
REFERÊNCIAS GERAIS		94

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com maior diversidade de organismos em ecossistemas aquáticos continentais do planeta, e também um dos que mais sofre com as atividades humanas nesses ambientes. Em particular as comunidades de peixes são extremamente afetadas pela poluição, eutrofização, assoreamento, pesca excessiva, introdução de espécies e construção de barragens (AGOSTINHO et al., 2005).

Dentre estes distúrbios a construção de barragens se destaca por alterar expressivamente a dinâmica do rio, tanto a jusante quanto à montante do empreendimento (NILSSON et al., 2005). Uma vez que este tipo alteração ocorre, o recrutamento de peixes (sobrevivência dos indivíduos até a fase reprodutiva) fica completamente comprometido, em especial para as espécies de peixes com hábito migrador que dependem de diferentes fatores e diversos ambientes para completar seu ciclo reprodutivo (VAZOLLER et al., 1996; AGOSTINHO et al., 2005; SUZUKI et al., 2009).

Situada na região mais densamente ocupada do país, a bacia do alto rio Paraná foi altamente impactada nas últimas décadas com a construção de barramentos (AGOSTINHO et al., 2008). Como exemplo, o rio Paranapanema, um dos principais afluentes desta bacia, atualmente é fragmentado por 11 barragens que segmentam o rio em um sistema de cascata (DUKE ENERGY, 2008). Alguns trechos do rio encontram-se desprovidos de acesso a tributários e áreas lóticis confinando as populações residentes em ambientes lênticos sem qualquer acesso a rotas migratórias alternativas, o que pode levar a diminuição ou a ausência de atividade reprodutiva de várias espécies de peixes (VIANNA e NOGUEIRA, 2008; SUZUKI, 2009; ORSI, 2010).

Frequentemente as ações mitigatórias de impactos causados por hidroelétricas concentram-se na reposição maciça de indivíduos de algumas espécies nos lagos dos reservatórios. No entanto, a eficiência destas ações é contestada na literatura, uma vez que

informações básicas sobre a necessidade de reintrodução e sobrevivência destes indivíduos reintroduzidos são constantemente ignoradas ou ausentes (AGOSTINHO et al., 2003; 2008). Deste modo, avaliar quais espécies completam com sucesso o processo de recrutamento populacional, bem como os locais que servem a este fim é imprescindível para elaboração de planos para conservação eficientes.

Uma das maneiras mais eficazes de avaliar o processo de recrutamento é através da quantificação e identificação dos produtos reprodutivos (ovos e larvas) das espécies locais (NAKATANI et al., 2001). No entanto, a identificação destes produtos reprodutivos é extremamente complexa, mesmo para taxonomistas experientes, uma vez que muitas das características morfológicas ainda não estão desenvolvidas o suficiente para serem analisadas. O processo de identificação de ovos e larvas pode ser, por vezes, extremamente laborioso e demandar conhecimento especializado sobre a fauna local (PEGG et al., 2006; WARD et al., 2009), tornando a identificação muitas vezes inviável.

Os métodos taxonômicos tradicionais apresentam algumas limitações, quando se avalia organismos em diferentes estados de desenvolvimento, o que impedem a identificação das amostras em nível de espécie, chegando, em alguns casos, apenas em nível de ordens e famílias (NAKATANI et al., 2001), restringindo a disponibilidade de informações acerca dos processos que influem na sobrevivência das fases iniciais de desenvolvimento das diferentes espécies nestes ambientes alterados.

Este cenário contribui para redução do número de trabalhos sobre a eficácia reprodutiva de peixes bem como a composição das assembleias ictioplanctônicas. Por exemplo, o rio Paranapanema possui apenas três trabalhos, dos quais apenas dois (VIANNA e NOGUEIRA 2008; KIPPER et al., 2011), focam diretamente na análise das comunidades ictioplanctônicas.

Neste contexto, o emprego de ferramentas moleculares para correlação entre indivíduos adultos e seus produtos reprodutivos em nível de espécie passa a ser de grande valia. Embora estudos visando à identificação molecular de espécies tenham se iniciado em meados do século passado (1960 – 1970) e ainda sejam relativamente frequentes, somente no início deste século uma metodologia proposta por Hebert e colaboradores (2003a), denominada DNA *barcoding*, apresentou características suficientes para compor um sistema de identificação eficiente, como demonstrado em vários trabalhos com diferentes espécies animais, como em borboletas (HEBERT et al., 2004^a), em pássaros (HEBERT et al., 2004b), em larvas e peixes marinhos (WARD et al., 2005; PEGG et al., 2006), em peixes dulcícolas da região Neotropical (CARVALHO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; 2013).

De acordo com Hebert et al. (2003a; 2003b) apenas um pequeno trecho (aproximadamente 648pb) da extremidade 5' do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase (COI, CO1 ou Cox1) seria capaz de identificar a maior parte da diversidade biológica da terra, principalmente em metazoários superiores. A eficiência desta metodologia aliada ao robusto sistema de padronização tornou esta metodologia objeto de um robusto sistema de bioidentificação baseado em informações de espécimes devidamente identificados e catalogados (WARD et al., 2009).

Atualmente, dez anos após a criação do *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL, ver www.barcodeoflife.org) e praticamente no término da primeira fase de colaboração do *Internacional Barcode of Life* (IBOL, ver www.ibol.org), aproximadamente 2,9 milhões de sequências correspondendo a 210 mil espécies encontram-se disponíveis em um grande banco de dados público de acesso livre o *Barcode of Life Data Systems* (BOLD, ver www.boldsystems.org). Deste modo, o uso desta metodologia torna-se uma promissora ferramenta para a identificação dos produtos reprodutivos com alto nível de confiabilidade.

As análises geradas a partir desta metodologia podem evidenciar quais espécies, de fato, concluem o processo de recrutamento meio às perturbações causadas pelos barramentos.

Os resultados do presente trabalho foram divididos em dois capítulos que se seguem após a fundamentação teórica, que por sua vez, objetiva dar suporte para interpretação dos dados posteriormente apresentados.

2. OBJETIVOS

Considerando a complexidade da identificação morfológica de ovos, larvas e juvenis de peixes, a importância destes para a avaliação do processo de recrutamento de diversas espécies componentes da ictiofauna do médio rio Paranapanema, além da influência deste processo na manutenção da diversidade de peixes o presente estudo visa:

- Realizar a identificação molecular dos ovos e larvas de peixes do médio-baixo rio Paranapanema através da análise da porção 5' do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I (CO1).
- Avaliar a eficácia da metodologia *DNA barcoding* na identificação de amostras de ictioplâncton em uma região com ictiofauna altamente diversificada, tal qual a região neotropical, especificamente no rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná.
- Relacionar as áreas estudadas com a atividade reprodutiva das espécies locais, a fim de fornecer uma visão dos principais sítios reprodutivos para cada espécie.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 DIVERSIDADE DE PEIXES E A REGIÃO NEOTROPICAL

Os peixes correspondem a pouco mais da metade das espécies de vertebrados, com aproximadamente 33.000 espécies válidas catalogadas em relação aos outros 27.000 tetrápodes. No que tange o ambiente de água doce, aproximadamente 14.800 spp., são dulcícolas ou apresentam parte de seu ciclo de vida nesses ambientes. Dentre as 515 famílias de peixes conhecidas ainda vivas, nove compreendem aproximadamente 33% de todas as espécies (10.890 spp.), das quais 66% (7.188 spp.) são dulcícolas ou possuem parte de seu ciclo de vida neste ambiente (BISBY, 2014; ESCHEMEYER; FRICKE, 2014; FISHBASE, 2014).

A região Neotropical abrange uma das maiores concentrações de diversidade biológica da Terra (REIS; KULLANDER; FERRARI, 2003; AGOSTINHO et al., 2005). No que tange a diversidade da ictiofauna, essa região também se mostra como a mais rica do planeta. Lèvêque et al. (2008) em um levantamento da diversidade de peixes de água doce no mundo encontraram aproximadamente 74 famílias e 4.035 espécies somente na América do Sul (Figura 1). Os números da diversidade de peixes de água doce para a região neotropical variam na literatura em cerca de 30 a 40% de toda a diversidade de espécies de peixes de água doce do mundo (LUNDBERG et al., 2000; REIS; KULLANDER; FERRARI, 2003; AGOSTINHO et al., 2005; DUDGEON et al., 2006; LÈVÊQUE et al., 2008).

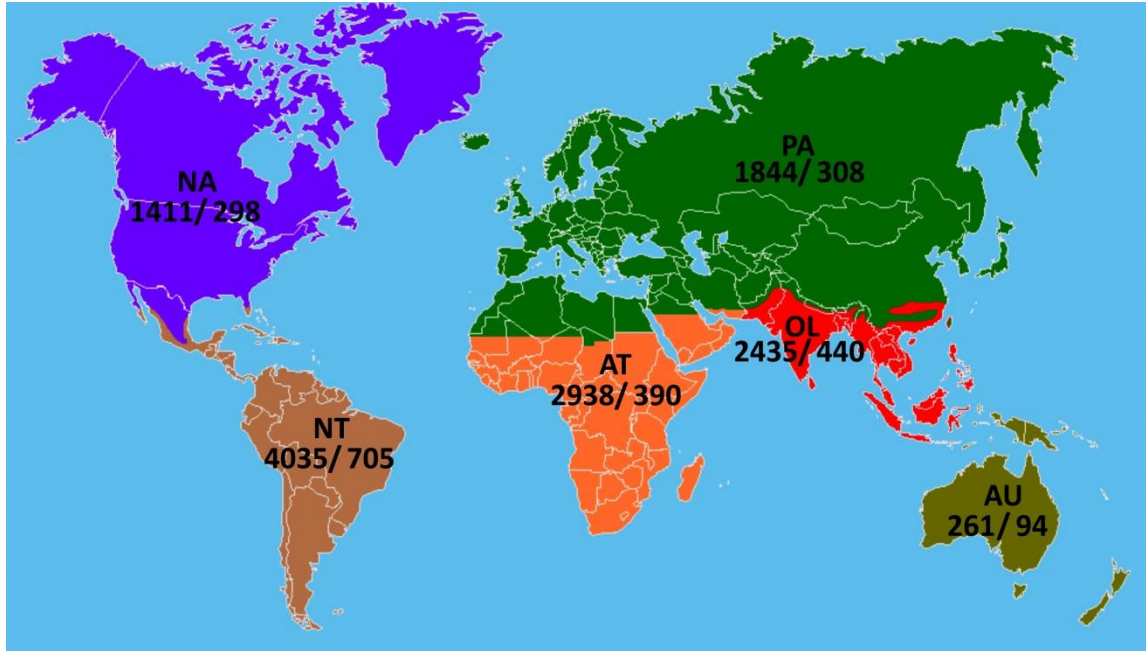


Figura 1: Distribuição do número de espécies de peixes descritas por região zoogeográfica (número de espécies/número de gêneros). Adaptado de Lèvéque et al. (2008). NA, Região Neoártica; NT, Região Neotropical; PA, Região Paleártica; AT, Região Afrotropical; OL, Região Oriental, AU, Região Australasia

Além do elevado índice de diversidade, a região neotropical também apresenta altas taxas de endemismos. Estima-se que cerca de 70% da ictiofauna de águas continentais na América do Sul seja exclusivamente restrita a essa região (LÈVÉQUE et al., 2008). Estes altos índices de diversidade e endemismo observados na região Neotropical podem estar relacionados à grande área geográfica disponível, variação das condições ambientais e a correlação positiva destes fatores com os índices de diversidade (MACARTHUR; WILSON, 1967; RICLEFS, 2005).

Especificamente para peixes a disponibilidade de áreas ocupáveis tem posição de destaque, uma vez que a região neotropical possui um dos maiores sistemas hídricos fluviais do planeta (OKI; KANAE, 2006), além disso de Lèvéque et al. (2008) demonstram empiricamente a existência de uma correlação positiva entre riqueza de espécies e área de drenagem das bacias. No entanto, a importante influência da disponibilidade geográfica não refute a influência de outros fatores na diversificação dos grupos, como por exemplo, a ampla

disponibilidade de energia e clima (WRIGHT, 1983), além da história biogeográfica e geológica (MACARTHUR; WILSON, 1967).

Contudo, a real diversidade de peixes em águas continentais brasileiras ainda é imprecisa, muito devido à falta de inventários completos e revisões precisas sobre o status taxonômico de algumas espécies e alguns grupos. O exponencial aumento da descoberta de novas espécies desde 1758, ano dos primeiros trabalhos de Linnaeus com descrição de espécies de peixes, é apontado por Langeani et al. (2007) como um forte indicativo de que a diversidade da ictiofauna brasileira encontra-se, na verdade, subestimada. Uma estimativa realizada por Reis et al. (2003) aponta que apenas 60% da ictiofauna brasileira tenha sido descrita.

Mesmo com dados subestimados o Brasil é apontado na literatura como o país com maior diversidade de peixes de água doce do planeta, correspondendo à aproximadamente 21% da diversidade de peixes de todo o mundo (AGOSTINHO et al., 2005; BUCKUP; MENEZES, 2007).

3.2 ALTO RIO PARANÁ, RIO PARANAPANEMA E ICTIOFAUNA

Inserida em uma das regiões mais densamente ocupadas do Brasil, a bacia do rio Paraná é a segunda maior bacia hidrográfica do país, ficando atrás em área drenada apenas para o complexo hidrográfico da bacia Amazônica constituindo, deste modo, uma das maiores drenagens da região Neotropical (STEVAUX et al., 1997).

A porção alta da bacia do rio Paraná é atualmente uma das mais bem estudadas da América do Sul. Em uma revisão histórica sobre a diversidade de peixes da bacia do alto rio Paraná, Galves et al. (2009) encontraram relatos de trabalhos sobre inventários ictiofaunísticos nos rios do interior do estado de São Paulo datados de 1900, além de verificarem um exponencial aumento de trabalhos sobre esta área nas últimas décadas.

Os dados levantados até o presente momento indicam que o alto rio Paraná é representado por 310 espécies de peixes identificadas, distribuídas em 12 ordens e 38 famílias, e que grande parte desta riqueza encontra-se em pequenos tributários e riachos (LANGEANI et al., 2007).

Dentre os formadores da porção alta do rio Paraná, o rio Paranapanema destaca-se como um importante tributário da margem esquerda do rio Paraná com aproximados 660 km de extensão dos quais 330 km delimitam a divisa entre os estados do Paraná e São Paulo (MAACK, 2002). No que tange a composição ictiofaunística, o rio Paranapanema contém aproximadamente 155 espécies que se distribuem em nove ordens, com grande contribuição de seus tributários (HOFFMAN et al., 2005; DUKE ENERGY, 2008). Devido à fragmentação deste rio pelos empreendimentos hidroelétricos a maioria dos estudos já realizados é direcionada aos vários lagos artificiais (GALVES et al., 2009).

Para o trecho do alto rio Paranapanema um dos reservatórios mais estudados é o reservatório de Jurumirim, formada em 1962 pela construção da UHE Armando Alvellanal Laydner. Carvalho et al. (1998) identificaram 51 espécies de peixes, pertencentes a seis ordens e 17 famílias, todas nativas.

Já a taxocenose de peixes para o fragmento do reservatório de Capivara, formado pela barragem da UHE Escola de Engenharia Mackenzie (médio rio Paranapanema), é composta por 77 espécies distribuídas em cinco ordens e 20 famílias, tendo a predominância das ordens Characiformes e Siluriformes (HOFFMAN et al., 2005); sendo esta característica um padrão encontrado para a ictiofauna dos rios neotropicais (LOWE-MACCONNEL, 1999). Dados mais atuais publicados por Orsi (2010) acrescentam duas espécies a este número totalizando 79 espécies.

O acréscimo dos dados de riqueza de espécies dos tributários da porção média do rio Paranapanema torna evidente a importância destes tributários na composição da diversidade

de peixes em reservatórios, uma vez que apenas o trecho do rio Tibagi apresenta aproximadamente de 123 espécies (SHIBATTA et al., 2002; SHIBATTA; GEAL; BENNEMAN, 2007).

A ictiofauna da região do baixo rio Paranapanema, reservatório de Taquaruçu, é formada por 78 espécies, das quais 38 pertencem à ordem Characiformes, 35 à ordem Siluriformes, cinco à ordem Perciformes (BRITO; CARVALHO, 2006).

O gradiente crescente na riqueza de espécies observado no sentido nascente-foz, para o médio rio Paranapanema, corrobora com a hipótese de Vannote et al. (1980). De acordo com estes autores, o aumento do aporte de matéria orgânica transportada (entrada de energia no meio) concomitantemente ao volume do corpo d'água, proporciona uma ampliação nas populações dos produtores primários refletindo em um acréscimo na complexidade das comunidades bióticas locais. Permanentemente comunidades biológicas naturais buscam estratégias de processamento e fluxo de energia visando à menor perda possível. A disponibilidade de nichos torna possível a diversificação da biota em um efeito cascata juntamente com a diversidade biótica de produtores. No entanto, os consecutivos barramentos constituem importantes impedâncias à dinâmica natural do rio.

3.3 ESTUDOS COM ICTIOPLÂNCTON NA BACIA DO ALTO RIO PARANÁ

Se por um lado a ictiofauna do alto rio Paraná é uma das mais inventariadas do país ainda poucos estudos abordam a diversidade das assembleias ictioplanctônicas e a biologia das fases iniciais de desenvolvimento dos peixes neotropicais (NAKATANI et al., 2001).

O ictioplâncton pode ser definido como um constituinte do merozooplâncton (parte do zooplâncton que apresenta apenas uma etapa do ciclo de vida na região planctônica), compreendendo ovos e larvas de peixes, sendo o componente mais importante da comunidade planctônica em termos econômicos (SMITH; JOHNSON, 1996). Durante o ciclo de vida, os peixes transitam entre diferentes comunidades, usualmente na região planctônica quando nos

estágios de ovo ou larva, e como parte do nécton e/ou bentos quando juvenis e adultos (PARSONS et al., 1984).

Por padrão, em grande parte das bacias hidrográficas da região Neotropical, os peixes (principalmente os Teleostei) seguem o mesmo modelo encontrado na bacia do alto rio Paraná, onde o deslocamento reprodutivo ocorre nos meses quentes, com início na primavera e término ao fim do verão. Portanto, o período compreendido entre os meses de setembro e fevereiro apresenta as maiores densidades de ovos e larvas (NAKATANI et al., 2001; CASTRO et al., 2002; ORSI et al., 2002; 2010; BIALETZKI et al., 2005; VIANNA; NOGUEIRA, 2008; REYNALTE-TATAJE et al., 2011). De acordo com Agostinho et al. (2004), a sazonalidade reprodutiva da maioria das espécies de peixes de água doce está relacionada com a presença de condições favoráveis que maximizam a fecundação, desenvolvimento e consequente sobrevivência da prole.

Estudos que envolvam ictioplâncton são ferramentas eficientes na caracterização da relação entre espécies de peixes e o respectivo sucesso reprodutivo em todos os ambientes aquáticos (NAKATANI et al., 2001; BIALETZKI et al., 2005; KIPPER et al., 2011). Os mesmos autores salientam que apesar de estudos serem realizados desde 1992 por Baumgartner, Nakatani e colaboradores a bacia do alto rio Paraná, principalmente na porção acima do rio Ivinhema, apresenta poucos trabalhos em relação ao ictioplâncton, dentre esses se destacam os trabalhos de Ziober et al. (2012) no rio Cuiabá, Reynalte-Tataje et al. (2011) no rio Ivinhema, Baumgartner et al. (2004; 2008) na calha do alto rio Paraná e dois afluentes, e Bialetzki et al. (2005) no rio Baía, dentre outros importantes estudos na bacia.

O rio Paranapanema encontra-se em situação mais precária quanto ao conhecimento da composição do ictioplâncton, uma vez que apenas dois estudos foram conduzidos nessa região, o de Kipper et al. (2011) no Reservatório de Rosana, próximo à foz do rio, e o de Vianna e Nogueira (2008) em um afluente do Reservatório de Capivara, na porção média.

Recentemente Britto e Carvalho (2013) realizaram um estudo avaliando a movimentação dos peixes no médio rio Paranapanema em uma série de reservatórios através de um método de recaptura. No mesmo estudo os autores fizeram um levantamento superficial da comunidade ictioplanctônica, no entanto a amostragem teve baixa representatividade, e os dados foram pouco conclusivos. Portanto, fica evidente a necessidade de um estudo mais aprofundado deste importante tributário do rio Paraná, a fim de conhecer de forma objetiva sua fauna ictioplanctônica.

Os trabalhos realizados até o presente momento mostram que a composição do ictioplâncton da planície de inundação do alto rio Paraná está distribuída principalmente na ordem Characiformes (CASTRO et al., 2002; BIALETZKI et al., 2005). Salvo os dados apresentados por Baumgartner et al. (2008) no reservatório de Itaipu e alguns afluentes, onde Siluriformes exibiram maior densidade por cm^3 , no entanto com menor riqueza de espécies.

No que tange a composição do ictioplâncton do rio Paranapanema, Kipper et al. (2011) e Vianna e Nogueira et al. (2008) constataram o padrão de densidade e riqueza compatível com o encontrado para o alto rio Paraná, destacando a importância dos afluentes como sítios de desova e berçários para as espécies residentes dos trechos amostrados.

Além de informações sobre composição de comunidades e determinação de regiões de desova e berçário, estudos com ictioplâncton têm se demonstrado como importante ferramenta em outras áreas. A ocorrência de espécies exóticas como *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840), popularmente conhecida como corvina, dentre as amostras de ictioplâncton têm sido constantemente registradas na região do alto rio Paraná.

Mais especificamente no rio Paranapanema a ocorrência dessa espécie invasora foi registrada por Kipper et al. (2011) dentre as amostras de ictioplâncton coletadas. Essa ocorrência constata a transposição de um importante filtro no processo de estabelecimento de

espécies exóticas, que é a capacidade de completar seu ciclo reprodutivo no ambiente ao qual foi introduzida (VERMEIJ, 1996; SIMBERLLOF, 2009).

As informações levantadas sobre o ictioplâncton no alto rio Paraná indicam a grande influência dos fatores abióticos como temperatura, pH, oxigênio, condutividade e outros parâmetros na presença e composição do ictioplâncton (BAUMGARTNER et al., 2008). Vazzoler et al. (1996) já descrevia a importância desses fatores na determinação do ciclo reprodutivo dos peixes, bem como na incubação e desenvolvimento de ovos. Nakatani et al. (2001) salientam que a variação desses fatores influencia tanto negativa quanto positivamente o processo de desova e fertilização.

Além dos parâmetros limnológicos comumente citados, outros fatores abióticos como o nível e frequência de inundações na planície do alto rio Paraná (do qual o rio Paranapanema faz parte) são fortemente relacionados com a atividade reprodutiva dos peixes. A alteração da frequência natural de cheias afeta negativamente o processo reprodutivo de todas as espécies de peixes, no entanto em diferentes níveis de acordo com sua estratégia reprodutiva (AGOSTINHO et al., 2008).

Os mesmos autores destacam que as espécies com hábito migrador (com deslocamento acima de 100 km para desova) são mais intensamente afetadas, ao passo que as espécies sedentárias e com cuidado parental parecem sofrer menos com o controle de regime de cheias exercido pelas usinas hidroelétricas.

Diversos trabalhos indicam que a regulação do fluxo e nível dos rios alteram os parâmetros limnológicos, afetando indiretamente o ciclo reprodutivo das espécies em um nível adicional, além de influenciar na sobrevivência dos juvenis (AGOSTINHO et al., 2001; RODRIGUES et al., 2005; AGOSTINHO et al., 2008).

3.4 BARRAGENS, SEUS IMPACTOS E O REFLEXO NA REPRODUÇÃO DE PEIXES

A grande extensão das redes hidrográficas na região Neotropical e no Brasil constituem um dos principais fatores relacionado à megadiversidade de peixes (AGOSTINHO et al., 2005;2008; LEVÈQUE et al., 2008). No entanto, esta mesma extensão hidrográfica desperta grande interesse econômico, devido à crescente demanda energética de diversos setores da economia, resultando na superexploração dos sistemas hídricos no território nacional (AGOSTINHO et al., 1992).

A economia tradicional tem sido incapaz de determinar um valor para os recursos ambientais, fazendo com que os custos do esgotamento e dos danos causados aos recursos naturais sejam frequentemente desconsiderados. Deste modo, a degradação ambiental cresce em uma proporção logarítmica, ao passo que cresce também a demanda por recursos básicos naturais. Nos ambientes aquáticos, principalmente os continentais, isso se torna mais evidente, uma vez que na última década os humanos já captavam mais que 50% de todo o escoamento de água doce disponível (JACKSON et al., 2001).

No Brasil, a construção de reservatórios têm se intensificado nas principais bacias hidrográficas desde 1950, principalmente para geração de energia elétrica, mas também, com finalidade de irrigação e abastecimento (TUNDISI; MATSURA-TUNDISI, 2003). Como resultado desses empreendimentos, praticamente todos os grandes rios da região Sudeste e Centroeste estão hoje sobre influência de barragens totalizando (AGOSTINHO et al., 2008) De acordo com informações do Banco de Geração da União (ANEEL, 2013) até o final do daquele ano 1103 empreendimentos hidroelétricos encontravam-se em operação, além de outros 38 empreendimentos em construção e outros 201 empreendimentos outorgados.

Não apenas no Brasil, mas em todo mundo a presença de barragens têm se tornado um fato frequente nas bacias hidrográficas continentais. No início da última década,

aproximadamente 1 milhão de grandes barragens fragmentem os sistemas fluviais em todo o planeta (JACKSON et al., 2001).

Apesar de importantes para o desenvolvimento econômico, os barramentos promovem alterações graves e irreversíveis no regime hidrológico natural dos rios, alterando também a qualidade dos habitats e a dinâmica de toda a biota (AGOSTINHO et al., 1992, 2008). Além de interromperem os movimentos de peixes potamódromos (com comportamento migrador), tornando-se possivelmente, o principal fator que afeta a abundância de espécies migradoras (AGOSTINHO et al., 2005).

Apesar das várias modificações causadas por esses empreendimentos, Petts (1984) organizou algumas dessas modificações em uma sucessão temporal de impactos classificadas em ordens:

- i) Impactos de primeira ordem: incluem alterações químicas, físicas, geomorfológicas e modificações hidrológicas, como consequência da redistribuição espacial e temporal do fluxo do rio;
- ii) Impactos de segunda ordem: envolvem modificações na estrutura e dinâmica de produtores primários, em adição às alterações geológicas no canal do rio;
- iii) Impactos de terceira ordem: envolvem grandes modificações na comunidade de consumidores, especialmente invertebrados e peixes, como resultado de modificações no fluxo, dinâmica de produtores e da fragmentação de habitats.

Ainda de acordo com Petts (1984) após o barramento do rio, um novo sistema se desenvolve (por sucessão) e pode até chegar a um período de maior estabilidade ou de menor variabilidade funcional (Figura 2). No entanto, a ocorrência de novas perturbações e distúrbios internos (uma característica comum em represamentos) pode interromper a dinâmica de sucessão.

Deste modo, outros fatores são capazes de influenciar ou promover alterações no ambiente empreendido, tais como as operações de barragens em si, a introdução de espécies exóticas, ocupação de bacias hidrográficas (agrícola, industrial e urbano), a construção de novas barragens ou até mesmo a remoção destas (AGOSTINHO et al., 2008).

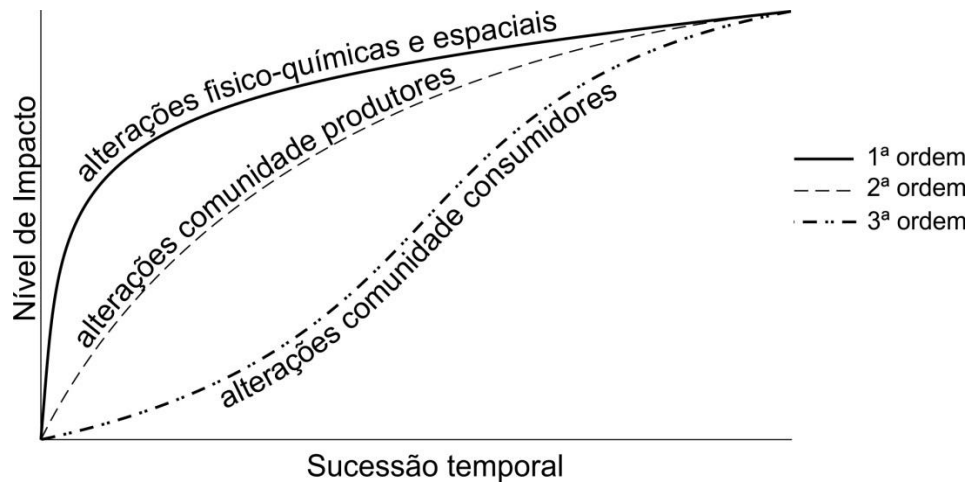


Figura 2: Esquema hipotético de sucessão temporal de impactos causados após implantação de barramentos com ausência de impactos adicionais. De acordo com Petts (1984).

Vale ressaltar que na abordagem temporal de Petts (1984) à medida que a sucessão de impactos ocorre, principalmente quando atinge o estágio de impactos de terceira ordem, estes se tornam progressivamente agudos à medida que o período de exposição das espécies à situação de estresse aumenta e o limiar de tolerância das mesmas é ultrapassado. Este quadro de acordo com Agostinho et al. (2007) pode gerar alta mortalidade ou fugas maciças.

Por outro lado, como proposto por Agostinho et al. (1992), os impactos podem assumir caráter crônico à medida que as alterações sucessionais estabilizam e se tornam graduais sendo decorrentes de interações físico-químicas e biológicas influenciando as espécies restantes no reservatório.

A despeito da organização temporal proposta por Petts (1984), Agostinho et al. (1992) propõem uma divisão espacial dos diferentes impactos causados por barragens dividindo-os

em impactos à montante do barramento, no corpo do reservatório e à jusante do mesmo, o que permite uma análise dos impactos concomitantemente ao funcionamento do reservatório.

Nesta classificação dentre os inúmeros impactos causados à montante do reservatório pode-se citar a ampliação de ambientes lênticos e consequente proliferação de espécies associadas a estes ambientes, eliminação de barreiras geográficas naturais, como no caso de Itaipu, possibilitando inúmeras invasões de espécies alóctones, ou seja, que não são naturalmente distribuídas naquela região (AGOSTINHO et al., 2007, 2008; SIMBERLLOF, 2009).

No corpo do reservatório, dependendo da forma e área do mesmo, um gradiente hidrológico longitudinal (águas lênticas para lólicas) mais ou menos definido é formado da barragem em direção montante da mesma. Esse gradiente é determinante sobre as condições limnológicas ao longo da extensão do reservatório, que por sua vez exerce forte influência sobre a biota relacionadas a cada zona do mesmo, denominadas como zona lêntica (extremidade mais próxima à barragem), de transição e lólica (extremidade mais distante da barragem) (AGOSTINHO et al., 2004b, 2008).

Agostinho et al. (1992) ainda cita como impacto no corpo do reservatório: 1) a inundação de áreas sazonalmente alagáveis, fundamentais para desova e desenvolvimento de várias espécies de peixes (VAZOLLER et al., 1996); 2) estratificação térmica e concentrações de oxigênio inversamente proporcionais à profundidade do reservatório podendo chegar à anoxia; 3) eutrofização e deterioração da qualidade da água; 4) acúmulo de sedimentos no lago reservatório; 5) redução na relação de área terrestre e área aquática no reservatório proporcionalmente à profundidade.

Por fim, a região à jusante sofre com alterações tão importantes quanto à área inundada. Dentre os principais fatores impactantes pode-se citar a redução de área sazonalmente alagáveis, alterações no carreamento de sedimentos, que provoca uma maior

transparência na água e aumenta a pressão exercida por predação, a drástica redução de vazão em períodos de seca e conseqüente exposição do leito mesmo antes do início das operações da usina, supersaturação gasosa, mortalidade de peixes em turbinas e vertedouros, fragmentação dos ambientes aquáticos, dentre outros impactos desencadeados por estes e por outros processos complexos dependentes da composição biótica local (AGOSTINHO et al., 1992; 2004b; 2008).

Bunn et al. (2002) salientam que a alteração do regime natural de inundação altera dramaticamente as condições de sobrevivência da biodiversidade aquática em locais com presença de barramento.

Devido a alguns princípios básicos a ecologia destes ambientes fica completamente alterada, uma vez que o fluxo hidrológico é o principal determinante dos fatores físicos do ambiente (BUNN et al., 2002). Além da história evolutiva e estratégias reprodutivas das espécies estarem intimamente relacionadas com o regime de fluxo do rio, e de por fim, a alteração deste regime natural favorecer o estabelecimento de espécies exóticas e/ou generalistas (AGOSTINHO et al., 2004; SIMBERLLOF, 2009).

Após toda a sucessão de impactos os ambientes tendem a certa estabilidade onde as poucas espécies restantes no local se rearranjam em uma nova comunidade (AGOSTINHO et al., 2004; FERNANDEZ et. al., 2009). Apesar da aparente estabilidade a nova comunidade entra em na fase de impactos de natureza crônica (AGOSTINHO et al., 1992). Geralmente após a eliminação das fontes de impacto os efeitos sobre as populações persistem, principalmente do ponto de vista genético quando essas populações são reduzidas e/ou o fluxo gênico entre essas é cessado (FRANKHAM, 2003).

De fato a fragmentação dos ambientes é uma das principais causas da perda de diversidade neste século. Levando em consideração que além de cessar o fluxo gênico entre populações a fragmentação de habitats pode reduzir imediatamente o tamanho populacional, o

que, por sua vez, pode ter efeito ainda mais acentuado se considerado o “N” efetivo das populações dependendo do tipo, mecanismo, e estratégia reprodutiva de cada espécie (VRIJENHOCK et al., 1998; AGOSTINHO et al., 2005; FRANKHAM et al., 2008).

Frente ao exposto, fica nítido que as alterações causadas por este tipo de empreendimento comprometem direta e indiretamente a reprodução, sobrevivência e desenvolvimento dos peixes e seus produtos reprodutivos, em diferentes escalas temporais e espaciais.

3.5 DIVERSIDADE, GENÉTICA E CONSERVAÇÃO

O termo biodiversidade é genericamente utilizado para expressar a riqueza de espécies, ou seja, o número de espécies presentes em uma unidade geográfica definida, no entanto o mesmo termo pode abranger uma gama de significados ainda maior, desde a diversidade biológica de táxons superiores à diversidade genética de subpopulações, podendo ser analisada a partir de caracteres morfológicos ou diferença entre as moléculas dos organismos (TOWNSEND et al., 2006).

Desde a sua origem a expressão diversidade biológica (biodiversidade) já trazia a ideia do conjunto de variabilidade ecológica e genética (SOLÉ-CAVA, 2001). Em uma abordagem ecológica, a biodiversidade pode ser definida como o número, variedade e variabilidade de organismos vivos dentro de uma escala temporal e espacial (BICKHAM et al., 2000).

Em uma abordagem genético-evolutiva a biodiversidade pode ser encarada como um produto da evolução biológica, cuja diversidade de formas é fruto do acúmulo de variações hereditárias, inicialmente polimórficas dentro de espécies, que posteriormente se fixam em unidades taxonômicas (SANTOS et al., 2009).

Levando em consideração a origem da informação que codifica a diversidade morfológica dos organismos, a biodiversidade nada mais é que fruto da diversidade genética, que por sua vez, pode ser definida como diversidade de alelos nos vários locos de uma

espécie, os quais se combinam produzindo variação genotípica e essa é herdada pela prole a partir de seus genitores ao longo das gerações, podendo expressar ou não alguma variação fenotípica (SOLÉ-CAVA, 2001; SANTOS et al., 2009).

Neste contexto, uma subárea da genética denominada genética da conservação, se apresenta com importante papel de reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas através do uso das teorias e técnicas da genética para o estudo dessa diversidade em sua fonte. O principal objetivo dessa linha de pesquisa em longo prazo é preservar as espécies como unidades dinâmicas evolutivamente significativas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais, permitindo a elas manter o maior potencial evolutivo possível (FRANKHAM et al., 2008).

Embora seja de natureza crítica para a correta condução de programas de manejo, correta definição dessas unidades evolutivamente significativas (UES) é extremamente complexa (MORITZ, 1994). Principalmente devido à existência de biodiversidade críptica, que por definição corresponde a espécies idênticas ou muito parecidas morfologicamente que apresentam isolamento reprodutivo total ou parcial (GALETTI JR et al., 2008).

Essa diferenciação decorre do fato de que em qualquer espécie a variação genética produzida por mutação é organizada, mantida, eliminada ou dispersada entre subpopulações, de acordo com um complexo equilíbrio dinâmico entre migração, deriva genética e seleção, as quais atuam de modo integrado na flutuação das frequências alélicas de populações, subpopulações e metapopulações (HARTL; CLARK, 2008).

Ao longo do tempo subpopulações tendem a assumir caminhos evolutivos independentes umas das outras pela perda natural ou artificial dos mecanismos de manutenção do fluxo gênico, diferenciando significativamente suas frequências alélicas. Por tanto, as diferenças observadas entre populações e subpopulações nada mais são que o acúmulo e fixação de alelos e frequências alélicas diferentes. As espécies crípticas, muito

provavelmente, são um retrato momentâneo do processo de especiação em fase final, o qual retrata a presença de barreiras reprodutivas entre populações com diferenças pouco expressivas na composição e/ou frequências alélicas diretamente ligadas à características morfológicas (FUTUYMA e MORENO, 1988; FRANKHAM et al., 2008).

A falha na delimitação de uma UES pode levar a medidas de manejo equivocadas como a introdução de alelos incomuns não adaptados às especificidades ambientais da população receptora, o que por sua vez pode produzir um efeito adaptativo negativo, reduzindo o tamanho efetivo populacional e conseqüentemente a diversidade genética da população receptora (HAIG, 1998; HILSDORF; PETRERE, 2002).

Deste modo, a delimitação de UES precede qualquer ação de manejo, e passa obrigatoriamente pela correta definição do status taxonômico em nível de espécie, uma vez que a espécie corresponde à unidade básica de comparação em qualquer estudo biológico (FRANKHAM et al., 2008).

3.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Tradicionalmente a descrição e identificação de espécies são realizadas com base em caracteres morfológicos de indivíduos adultos. No entanto, muitas vezes esses caracteres não apresentam resolução suficiente para discriminar algumas espécies, ou por vezes, não é possível dispor de material em condições adequadas para análises morfológicas. Do mesmo modo, a identificação de fases iniciais de desenvolvimento dos organismos fica comprometida, tornando-se em muitos casos, inviável, uma vez que muito dos caracteres diagnósticos não estão presentes ou suficientemente diferenciados para comparação (NAKATANI et al., 2001; PEGG et al., 2006).

Com o desenvolvimento da biologia molecular novos caracteres tornaram-se disponíveis para análise da variabilidade e diversidade genética, dentro e entre os indivíduos, por meio do estudo de marcadores moleculares (SODRÉ, et al. 2002). Estes marcadores

tornaram-se um grupo de ferramentas indispensáveis para determinação da variação genética e, por conseguinte, da diversidade biológica, muito devido ao grau elevado de precisão e de reprodutibilidade (ARIF; KAHN, 2009). Por definição, marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma).

De fato, as isoenzimas na década de 1960 foram o primeiro grupo de moléculas estudadas com objetivo de identificar espécies. Manwell e Backer (1963) inauguraram este tipo de estudo evidenciando a existência de uma nova espécie de pepino do mar baseado no polimorfismo de vários sistemas isoenzimáticos em dois grupos daquela espécie.

Estudos com isoenzimas atualmente ainda são aplicados na discriminação de espécies de peixes neotropicais, com destaque para espécies da família Loricariidae. Os trabalhos de Zawadzki et al. (2008), Reusing et al. (2011) e Lucena et al. (2012), são exemplos de aplicações efetivas desta técnica para o auxílio de resolução de dúvidas taxonômicas, demonstrando em todos os casos diferenças significativas entre as frequências alélicas dos sistemas isoenzimáticos estudados.

No entanto, embora as isoenzimas sejam efetivas para alguns organismos, esta técnica apresenta algumas desvantagens, principalmente por se tratar de uma técnica laboriosa que demanda grande quantidade de material biológico fresco, além de ser susceptível a variações de regulação gênica e outros fatores ambientais (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1995; PIORSK et al., 2009). Devido principalmente ao problema de interferência ambiental na expressão de isoenzimas, outras técnicas ganharam espaço, principalmente marcadores baseados na análise direta da molécula de DNA (MATIOLI e PASSO-BUENO, 2001).

O primeiro método a ser utilizado para análise direta de DNA foi o método de RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*). Este método se baseia na digestão do DNA com uma ou mais enzimas de restrição, gerando assim fragmentos que podem variar em

número e tamanho entre indivíduos, as populações e espécies (DANA e NATHANS, 1971; JEFFREIS et al., 1985). Estas diferenças são atribuídas às mutações nos sítios de restrição, gerado polimorfismos detectados por hibridação de sondas com fragmentos de DNA clonados, obtidos através da ação de uma ou mais enzimas de restrição.

A técnica de RFLP inaugurou o princípio de “*fingerprints*” de DNA (impressões digitais de DNA), introduzido por Jeffreys et al. (1985), em um estudo sobre a hipervariabilidade de regiões minissatélites em humanos. Estes autores observaram que certos indivíduos apresentavam padrões únicos de bandeamento quando o DNA era tratado com um determinado conjunto de enzimas. Apesar da eficiência na análise do polimorfismo da molécula de DNA, a técnica RFLP apresenta problemas principalmente em sua execução, devido à necessidade de grande quantidade de material para as análises e/ou a utilização de clonagem, o que torna a técnica de difícil execução (TELETSCHEA, 2009).

Aproximadamente um ano após o importante trabalho desenvolvido por Jeffreys et al. (1985), Mullis e Faloona (1986) descreveram a técnica da reação em cadeia da polimerase, popularmente conhecida como PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), que juntamente com outras descobertas relacionadas à tecnologia do DNA recombinante, impulsionaram os estudos com marcadores moleculares baseados em polimorfismo de DNA. Desde então várias metodologias foram desenvolvidas para analisar os *fingerprints* de DNA, como a PCR-RFLP, RAPD, AFLP dentre outras (TAUTZ, 1989; WILLIAMS et al., 1991; VOS et al., 1995)

Os vários tipos de polimorfismos genéticos ao nível de DNA permitem a obtenção de diferentes padrões de *fingerprints* dependendo da ferramenta utilizada e da natureza do DNA observado. Esses polimorfismos podem ser classificados de acordo com a sua natureza molecular e localização no genoma. Aqueles presentes em cromossomos autossômicos mostram-se como bons marcadores individuais, desde que a diferença nas frequências alélicas entre duas populações supostamente parentais seja grande (SHRIVER et al., 1997; PARRA et

al., 1998). Análises baseadas em microssatélites para testes de atribuição e exclusão de paternidade, ou mesmo mais recentemente os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polimorfisms*), são exemplos do uso de marcadores moleculares para o estudo de polimorfismos autossômicos e identificação individual (DAVIS et al., 1999; BROOKES, 1999).

Já os polimorfismos em genomas de origem uniparental, como o DNA mitocondrial em animais, caracterizam-se por serem bons marcadores de linhagens, uma vez que não há recombinação meiótica entre segmentos desta molécula. Desta forma, os genes transmitidos às gerações seguintes permanecem inalterados nas matrilineagens até que ocorra uma mutação (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

3.7 GENOMA MITOCONDRIAL E DNA *BARCODING*

Em animais o DNA mitocondrial (DNAMt) é uma molécula única de DNA em dupla hélice, quase sempre em forma circular, com raras exceções encontradas em algumas classes de cnidários (Figura 3) (BOORE, 1999). Geralmente o genoma mitocondrial animal contém os mesmos 37 genes, dos quais 13 são genes proteicos, dois ribossomais, e 22 são genes para RNA transportador, além de uma região não codificante denominada região controle (*D-loop*) que controla a replicação do genoma mitocondrial (BOORE, 1999; WAUGH, 2007).

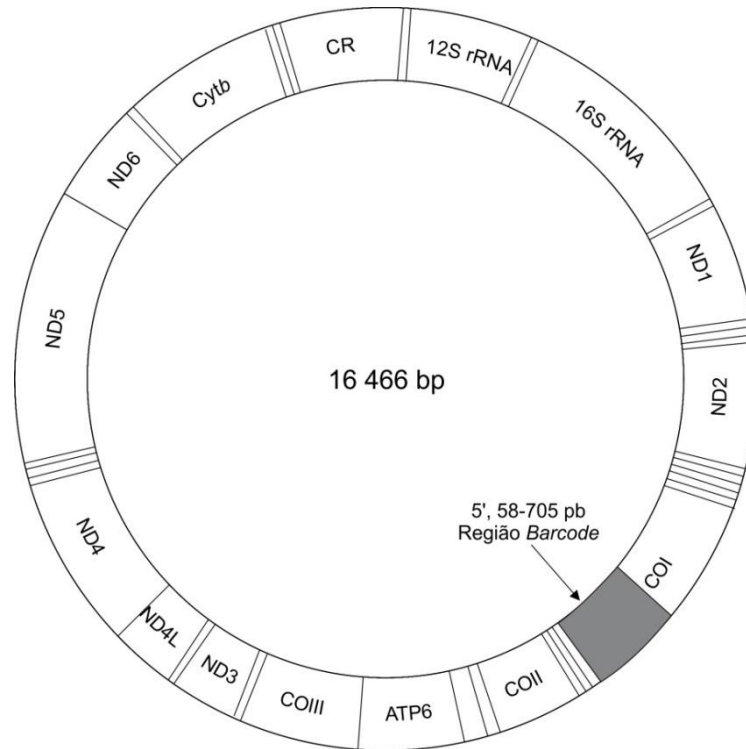


Figura 3: Esquema de organização do genoma mitocondrial em peixes baseado na espécie *Larimichthys crocea*. As posições relativas dos genes de RNA transportador estão indicadas pelas linhas transversais. Todos os genes codificadores de proteínas estão codificados na fita H com exceção do gene ND6. ND1-6, NADH desidrogenase subunidades 1-6 ; COI-III , citocromo *c* oxidase subunidade I-III; ATP6 e ATP8 , ATPase subunidades 6 e 8 ; Cyt *b*, citocromo *b*; CR , região controle. Adaptado de Cui et al. (2009).

Essas características tornam DNAm especialmente informativo para as questões em nível de espécie, particularmente quando as relações filogenéticas dizem respeito a táxons intimamente relacionados (MOORE, 1995; RUBINOFF, 2006). O DNAm pode ser uma poderosa ferramenta no esforço para identificar as espécies, suas relações entre si, e populações ameaçadas ou em perigo com haplótipos diferenciados (MORITZ, 1994; MORITZ e CICERO, 2004; AVISE 2004).

Os primeiros estudos utilizavam vários genes e diferentes partes desses, o que dificultava a comparação entre trabalhos, uma vez que é necessário conhecer previamente o genoma estudado a fim de construir *primers* para cada um desses genes, uma limitação típica da técnica de PCR específica (SAVOLLAINE et al., 2005; WARD et al., 2009).

Hebert et al. (2003a) propuseram uma metodologia diferenciada, no sentido de relacionar espécies validamente identificadas com sequências únicas de DNA, ou com baixa

divergência intraespecífica, utilizando uma região padronizada de um único gene a fim de organizar um sistema de bioidentificação para animais.

Para a eficácia desta abordagem é essencial que a seleção do gene seja feita corretamente, sua taxa de mutação deve ser baixa para possibilitar o agrupamento intraespecífico, ao passo que deve ser suficientemente alta para evidenciar diferenças interespecíficas (WAUGH, 2007).

Hebert et al. (2003b) constataram empiricamente a eficiência da porção 5' do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase, região conhecida como “Cox1” ou “CO1”. Essa região é parte de uma holoenzima composta por treze subunidades, das quais dez possuem origem nuclear e três subunidades sintetizadas na mitocôndria. As subunidades mitocondriais são conhecidas como subunidades I, II e III, classificadas assim em ordem crescente a partir da porção 5' da primeira subunidade (WAUGH, 2007).

A subunidade 1 (CO1) codifica um peptídeo transmembrana que se encontra quase totalmente embebido na membrana da crista mitocondrial, sendo responsável pela atividade catalítica da holoenzima citocromo oxidase. De modo que, as porções hidrofílicas do peptídeo CO1 estão ligadas a funções catalíticas formando alças direcionadas para o citoplasma e para o interior mitocondrial, enquanto as porções hidrofóbicas correspondem a regiões apenas estruturais que permanecem embebidas na bicamada lipídica da crista mitocondrial (SAVOLAIN, 2007).

Deste modo, a conjugação catalítico-estrutural deste peptídeo confere à sequência codificante no DNA um baixo nível de variação nucleotídica, principalmente nas porções catalíticas, o que permite relacionar indivíduos de uma mesma espécie. Enquanto as regiões estruturais apresentam um maior nível de variação, o que permite a diferenciação de indivíduos de espécies próximas, ou que apresente uma radiação recente (BLAXTER, 2004; WARD et al., 2009).

Baseado nessa fundamentação teórica, na eficiência dos *primers* descritos por Folmer et al. (1994) para a amplificação da região CO1 em diversos filos de metazoários, e em seus próprios resultados, Hebert et al. (2003a) propuseram o uso da região 5' do gene CO1 para a construção de um sistema de classificação global em animais, considerando a alta divergência de sequência entre espécies diferentes e baixa divergência dentro das espécies (WARD et al., 2009). Como constatado por Hebert et al. (2003b) em um estudo com 13.320 táxons, onde observaram distâncias genéticas intraespecífica de 1%, raramente 2%, enquanto que a diferença interespecífica média foi de 11,3%.

Posteriormente, vários outros trabalhos comprovaram a eficiência da metodologia proposta de Hebert et al. (2003a) para identificação de animais em diferentes espécies (em borboletas, HEBERT et al., 2004a; em pássaros HEBERT et al., 2004b; em larvas e peixes marinhos, WARD et al., 2005; PEGG et al., 2007).

Recentemente outros trabalhos também demonstraram que a metodologia DNA *barcoding* é eficiente mesmo frente a uma fauna megadiversa como no caso dos peixes da região neotropical (CARVALHO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011, 2013). Deste modo esta metodologia apresenta um campo extremamente vasto de aplicações às quais devem ser incorporada aos estudos a fim de obter dados mais precisos em relação ao status taxonômico.

Além dos trabalhos de resolução de dúvidas taxonômicas em animais, a metodologia de DNA *barcoding* tem sido aplicada também para validar a identificação de linhagens de células animais (LORENZ et al., 2005; COOPER et al., 2007), e identificação de diversidade críptica em alguns grupos já relativamente bem conhecidos, especialmente aves e mamíferos (HERBERT et al., 2004).

As críticas sobre a metodologia do DNA *barcoding* dizem respeito à tentativa de desenvolver trabalhos taxonômicos e descrição de novas espécies, além de análises filogenéticas baseados em um trecho pequeno de um único gene (LIPSCOMB, 2003;

MORITZ e CÍCERO, 2004; QUEIROZ, 2005). No entanto, a iniciativa do DNA *barcoding* não diz respeito ao uso de sequência de DNA como ponto principal na descrição de espécies, e sim uma tentativa de relacionar uma sequência única ou conjunto de sequência com baixos valores de divergência a unidades taxonômicas previamente definidas e validamente identificadas, utilizando essas sequências como um tipo de marcação para aquela unidade taxonômica (SAVOLAIN et al., 2005; WAUGH, 2007; WARD et al., 2009).

Como salientado por Lipscomb (2003), qualquer classificação de um organismo em status de espécie transcende à atribuição de um rótulo, uma vez que implica à elaboração de uma hipótese que busca correlacionar um conjunto de características a padrões pré-estabelecidos, a fim de que essa relação indique uma história evolutiva independente de outras entidades biológicas similares. Portanto, não é prudente realizar qualquer descrição com base em poucas fontes de dados. No entanto, marcadores moleculares, em especial a metodologia DNA *barcoding*, tem grande potencial para indicar problemas com a definição do status taxonômico dos organismos, facilitando e agilizando o trabalho da taxonomia e sistemática (HEBERT, 2003a; 2003b; WAUGH, 2007; WARD et al., 2009).

Embora historicamente os métodos de identificação, nomeação e classificação tenham sido baseados em caracteres morfológicos visíveis, as diferenças entre os organismos não se restringem exclusivamente a elas (QUEIROZ, 2005). Outros caracteres precisam ser incluídos nas análises, principalmente quando são estudados organismos em diferentes etapas de desenvolvimento, ou quando apenas é possível analisar restos fragmentários, total ou parcialmente processados de espécimes (WARD et al., 2009).

Neste contexto, o estudo com marcadores moleculares e caracteres genéticos, como o conduzido no presente trabalho, são de suma importância para expansão dos estudos acerca das assembleias ictioplanctônicas, possibilitando que as importantes informações fornecidas pelo estudo destes organismos sejam amplamente utilizadas.

Protocolo rápido e econômico de extração de DNA para ictioplâncton

Wilson Frantine-Silva¹, Fernanda Simões de Almeida¹

RESUMO

Ferramentas moleculares baseadas em DNA possuem grande potencial na busca de respostas genético-biológicas e seu uso tende a se tornar cada vez mais frequente nos estudos envolvendo ictioplâncton. O presente trabalho apresenta uma metodologia de extração rápida, simples e barata, baseada em Chelex100 e Proteinase K, testada na amplificação do DNAm t e nuclear de mais de 750 amostras das quais 632 foram submetidas ao sequenciamento do gene mitocondrial CO1 e 96 amostras submetidas à genotipagem automática por meio de marcadores microssatélites. Aproximadamente 83% das amplificações de DNAm t e 90% das amplificações de DNA nuclear apresentaram resultados positivos nos testes com genotipagem automática e sequenciamento. A técnica permite extração total do DNA de um grande número de amostras em poucas horas, sem uso de agentes tóxicos e com custo consideravelmente baixo.

Palavras-chave: Ovos e larvas, Chelex100, ictiofauna

¹Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380; Campus Universitário, CCB, CEP: 86.057-970, Londrina-PR, Brasil. wilsonfrantine@gmail.com; fernandasa@uel.br

INTRODUÇÃO

Estudos sobre as comunidades ictioplanctônicas são ferramentas eficientes para avaliar o sucesso reprodutivo de peixes em todos os ambientes aquáticos (Baumgartner et al., 2004). No entanto, muitas informações sobre a biologia das fases iniciais destes organismos são limitadas devido à dificuldade de identificação morfológica do material, visto que a descrição de espécies é fundamentada na análise de caracteres morfológicos de indivíduos adultos, e em muitos casos tais caracteres não estão completamente desenvolvidos para análise (Pegg et al., 2006). Além disso, estudos com ictioplâncton em águas continentais Neotropicais demonstram que cerca de 60-90% de todo ictioplâncton amostrado corresponde a ovos, os quais apresentam classificação ainda mais complexa (Baumgartner et al., 2004; Reynalte-Tataje et al., 2012).

Recentes métodos da biologia molecular podem auxiliar na difícil tarefa de identificação do ictioplâncton por meio de técnicas como DNA barcoding (Hebert et al., 2003), que atualmente disponibiliza uma grande quantidade de dados de espécimes validamente identificados e catalogados, alocados em bases de dados internacionais de acesso público, como o *Barcode of Life Data System* BOLD (Ratnasingham & Heber, 2007). Uma vez que o ictioplâncton é corretamente identificado em nível de espécie é possível aprofundar estudos a cerca da biologia das fases iniciais das espécies, empregando outros marcadores moleculares que podem ser utilizados em estudos de populações, filogeografia e filogenia de peixes.

Contudo, o alto custo em diferentes etapas dessas metodologias restringe o aumento do número de pesquisas. Kits comerciais de extração disponíveis no mercado apresentam bons resultados, porém com altos custos embutidos além de serem desenvolvidos para atender um pequeno número de amostras. Deste modo, desenvolver técnicas que facilitem todas as etapas

do estudo molecular com ictioplâncton é imprescindível para o avanço do conhecimento sobre a biologia das fases iniciais de desenvolvimento dos peixes.

Neste contexto, o presente trabalho descreve uma técnica simples, rápida e barata para a extração de um grande número de amostras de ovos e larvas de peixes, testando a eficiência da técnica por meio de amplificação via PCR do DNA mitocondrial de 846 amostras e de amplificação de DNA nuclear em 96 amostras. Por fim, os resultados de extração realizados com o protocolo descrito neste trabalho são comparados com um kit comercial de extração e amplificação direta a fim de comparar os resultados entre as duas metodologias.

MATERIAL E MÉTODOS

O ictioplâncton foi coletado em diferentes localidades ao longo do rio Paranapanema (Brasil) entre os meses de outubro de 2012 e março de 2013. Ainda em campo as amostras foram conservadas em 3 partes de álcool 98% para uma de água, em laboratório foram transferidas para álcool 98% e armazenadas à -20°C até triagem, quando foram transferidas para álcool 70% e permaneceram estocadas à -20°C até a realização dos testes. Todas as informações sobre as amostras utilizadas neste estudo, bem como as sequências analisadas estão disponíveis no banco de dados BOLD Systems (<http://www.boldsystems.org>) alocados no projeto *Fish's egg and larvae of Paranapanema river* (FELPR).

As amostras foram alocadas em placas de 96 poços com 200 ou 100 µL de tampão de extração para larvas e ovos, respectivamente. Cada 200 µL de tampão de extração continha 200mg de chelex100 (BIO-RAD), 0,1µg de proteinase K (Invitrogen) e água ultrapura (MilliQ) para completar o volume (ver soluções de trabalho, apêndice 1). Após vedadas, as placas foram agitadas em vortex por 10 segundos, levadas ao termociclador onde foram mantidas à 63°C por 55 minutos e aquecidas à 90°C por 5 minutos. Em seguida as placas foram armazenadas em freezer à -20°C. Como passo adicional pode-se incluir uma etapa de

centrifugação da placa (recomenda-se no mínimo 3000rpm) e retirada de sobrenadante, no entanto os testes preliminares realizados não apresentaram diferenças expressivas na intensidade de bandas no gel (dados não exibidos).

A amplificação do gene citocromo *c* oxidase CO1 (~650pb) foi realizada utilizando os *primers* FishF1-5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3' e FishR1-5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3' (Ward et al., 2005), utilizando o programa: desnaturação inicial de 5 min à 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30s, 54°C por 30s e 72°C por 1min, com extensão final de 10min à 72°C em termociclador MJ Research PTC-100. Cada reação foi realizada em volume final de 10µL com 1x de PCR Master Mix (Promega), 0,4 µM dos *primers* FishF1 e FishR1, aproximadamente 15ng DNA e água para completar o volume. Após amplificação, os produtos foram visualizados em gel de agarose 1%, (2µL de amostra + 2µL de tampão de carregamento e corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies)).

Após visualização, o restante do produto amplificado foi purificado com adição de 0,5µL de ExoStar™ 1-Step (Illustra™) seguindo recomendações do fabricante e encaminhadas para sequenciamento, onde as duas fitas foram sequenciadas em reações independentes, atendendo recomendações do protocolo descrito por Hajibabaei et al. (2005), para identificação molecular.

Para análise da amplificação do DNA nuclear apenas foram utilizadas amostras de ovos e larvas previamente identificadas como *Pimelodus maculatus*, utilizando os *primers* específicos para regiões microssatélites (P.mac02, P.mac03, P.mac04, P.mac05, P.mac06, P.mac 08, P.mac10 e P.mac11), descritos por (Paiva & Kalapothakis, 2008). As condições de amplificação seguiram o protocolo descrito por (Ferreira et al., 2013). Tanto o produto das reações de sequenciamento quanto o resultado das reações de genotipagem foram analisados em sequenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems Inc., CA, USA).

RESULTADOS

Foram realizadas 846 extrações entre amostras de ovos e larvas de peixes das quais 86% apresentaram resultados satisfatórios para a amplificação do gene mitocondrial CO1, com intensidade igual ou superior à representada como amostra B na figura 1 e quadro 1. Entre as 96 amostras testadas para amplificação de locos microssatélites apenas três falharam em todos os locos e sete apresentaram falhas para um ou mais locos, demonstrando eficiência de 96,87% nas reações com DNA nuclear.

Outras 96 amostras de larvas foram extraídas com um kit comercial de acordo com especificações do fabricante. Entre estas, 79,16% apresentaram resultados satisfatórios frente os testes de amplificação e sequenciamento do gene CO1. Não foi possível realizar testes de amplificação de DNA nuclear com as amostras extraídas com o kit comercial, uma vez que os *primers* microssatélites são específicos para a espécie *Pimelodus maculatus*, a qual não foi identificada entre as amostras extraídas com o kit.

Amostras de ovos e larvas com os níveis de intensidade de amplificação indicadas na Figura 1 apresentaram resultados para as leituras de sequenciamento e genotipagem semelhantes aos exibidos no Quadro 2 da Figura 1, com picos de alta intensidade e bem definidos.

A média de eficiência de amplificação do genôma mitocondrial, testada por meio da amplificação do gene CO1, foi maior nos testes realizados com o protocolo descrito no presente estudo, em comparação às extrações realizadas com o kit comercial testado, tanto para ovos quanto para larvas (Figura 2). Uma maior eficiência de amplificação foi observada para as amplificações com DNA nuclear, onde 95,77% (desvio padrão = 2,4%) das reações foram amplificadas com sucesso. Não foram encontradas diferenças significativas entre a diferença da eficiência de amplificação de amostras de ovos em relação às larvas em nenhuma das comparações realizadas.

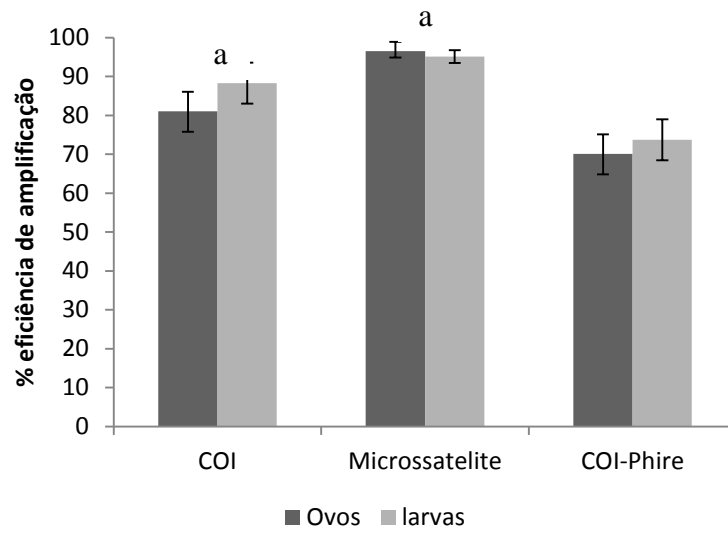


Figura 1: Comparação da eficiência de amplificação do DNA mitocondrial e nuclear de ovos e larvas com diferentes marcadores e diferentes metodologias de extração. a – Diferença significativa ao nível de 0,05 para comparações entre os resultados de amplificação do método do presentes estudo e o kit comercial de acordo com o teste T de Student.

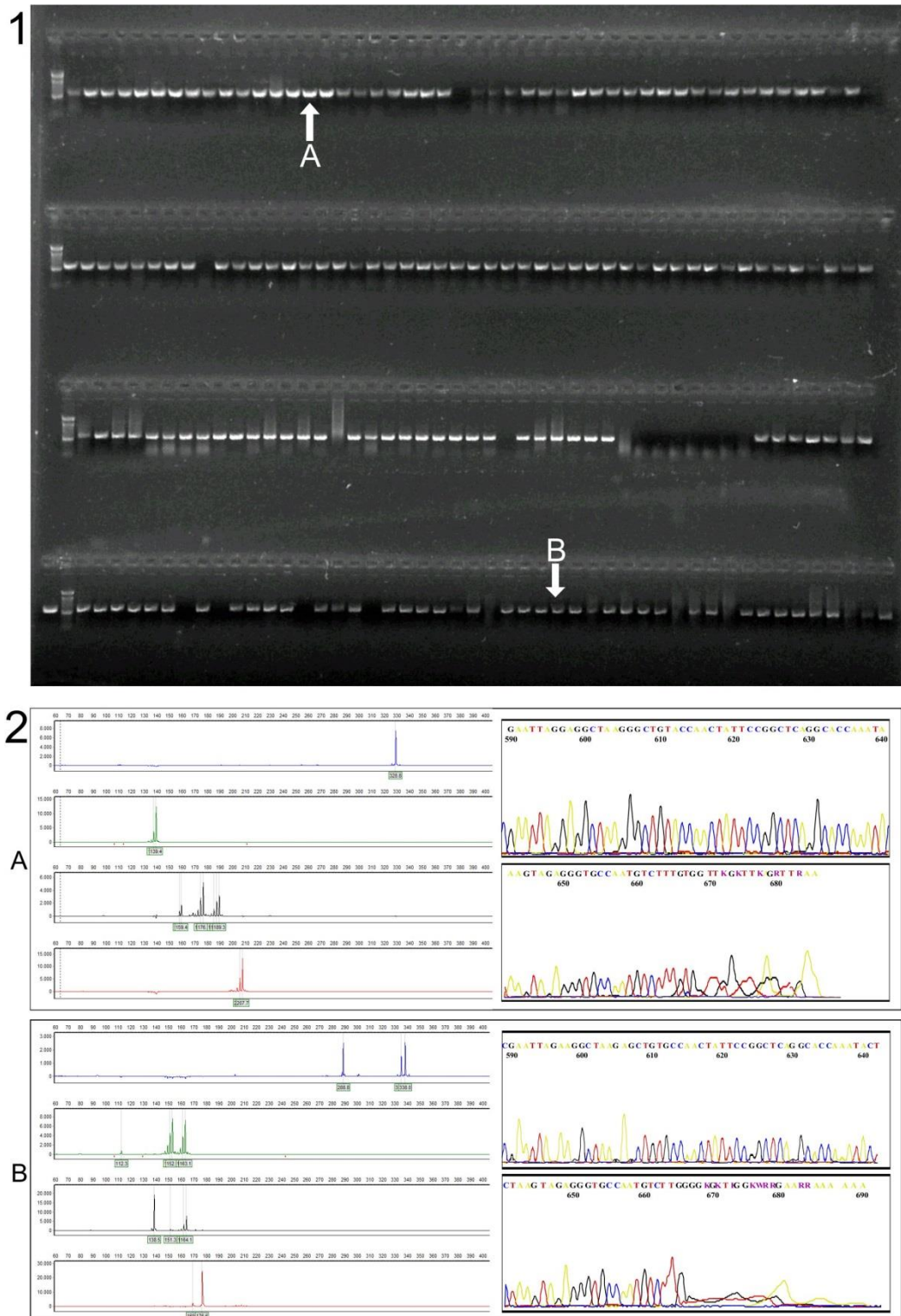


Figura 2 Amplificação, sequenciamento e genotipagem de amostras de ovos e larvas de peixes. 1- Amplificação do gene CO1 (~680pb) visualizado em gel de agarose 1%; “A”- representa uma amostra com banda de maior intensidade e B representa uma amostra com banda de menor intensidade. 2- Eletroferograma de genotipagem dos *primers* P.mac 03, P.mac05, P.mac08 e P.mac11 (Paiva et al., 2008) e sequenciamento do gene CO1 com *primer* FishF1(Ward et al., 2005), (exibido apenas o final da sequência, ver apêndice-2), das mesmas amostras A e B apontadas no quadro 1;

DISCUSSÃO

O presente estudo desenvolve um método de extração para ovos e larvas de peixes extremamente simples, rápido e econômico. O tampão de extração é bastante simples utilizando apenas uma resina quelante e um agente enzimático diluídos em água com pH neutro, o que contribui para a pureza da extração e elimina a necessidade de lavagens para retirada de detergentes, sais ou solventes orgânicos (Aljanabi e Martinez, 1997).

A técnica também demonstra ser bastante rápida e de fácil execução, com duração aproximada de duas horas para cada placa de 96 poços, o custo aproximado total do protocolo é consideravelmente reduzido. Estes atributos tornam o método bastante interessante para trabalhos com ictioplâncton que comumente analisam um grande volume de amostras (Baumgartner et al., 2004; Bialecki, et al., 2005; Reynalte-Tataje et al., 2012).

O protocolo se baseia na alta temperatura (65°C), ação enzimática da proteinase K e ação quelante da resina Chelex 100. Enquanto a temperatura desestabiliza a membrana de ovos e células de tecidos larvais, desnaturando proteínas, glicoproteínas e lipoproteínas associadas (Rizzo et al., 2002; Wiegand, 1996), a proteinase degrada as cadeias polipeptídicas expostas, ao passo que o Chelex 100 sequestra íons metálicos e outras substâncias à eles associados, precipitando-as juntamente com outros compostos de maior peso molecular (Walsh, 1991; Aranishi, 2006). A subsequente elevação da temperatura à 95°C desativa a proteinase K, além de desnaturar o DNA diminuindo seu peso molecular, propiciando o acúmulo desses ácidos nucleicos na porção superior da solução, uma vez que a velocidade de sedimentação é diretamente proporcional ao peso molecular do DNA (Burgi & Hershey, 1963). Caso haja a necessidade de centrifugação e resgate de sobrenadante é recomendável que ambas procedam imediatamente após à fase de desnaturação.

A alta proporção de eficiência entre os resultados do protocolo deste estudo em relação aos obtidos com o kit comercial Phire™, demonstram a eficácia do método de extração aqui

descrito, tanto para a utilização em estudos com DNAm_t quanto para estudos com DNA nuclear. No entanto, é importante ressaltar o baixo número de amostras analisadas com o kit comercial (apenas 96), além da impossibilidade de teste para DNA nuclear. De todo modo, o protocolo descrito mostra-se economicamente mais viável, uma vez que o custo aproximado de extração por amostra é cerca de 20 vezes menor que o custo do kit comercial utilizado para comparação.

A efetividade e facilidade desta técnica de extração é um passo a mais em direção da popularização das análises moleculares nos estudos envolvendo ictioplâncton, além de possibilitar a análise deste material em estudos filogenéticos, filogeográficos e populacionais, contribuindo também para a melhor aproveitamento dos escassos recursos direcionados à conservação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Duke Energy e CAPES pelo apoio financeiro e ao Laboratório de Ecologia de Peixes e Invasões Biológicas pelo auxílio nas coletas.

REFERÊNCIAS

- Aljanabi, S.M. & Martinez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), pp.4692–4693.
- Aranishi, F., 2006. Single Fish Egg DNA Extraction for PCR Amplification. *Conservation Genetics*, 7(1), pp.153–156.
- Baumgartner, G. et al., 2004. Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 71(1), pp.115–125.
- Bialetzki, A. et al., 2005. Larval fish assemblage in the Baía River (Mato Grosso do Sul State, Brazil): temporal and spatial patterns. *Environmental Biology of Fishes*, 73, pp.37–47.
- Burgi, E. & Hershey, a. D., 1963. Sedimentation Rate as a Measure of Molecular Weight of DNA. *Biophysical Journal*, 3(4), pp.309–321.
- Ferreira, D.G. et al., 2013. Development and characterization of 14 microsatellite loci in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). *Journal of fish biology*, 83, pp.1430–1438.

- Hajibabaei, M. et al., 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1), pp.1959–1967.
- Hebert, P.D.N. et al., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of The Royal Society. B Biological sciences*, 270(1512), pp.313–21.
- Paiva, A.L.B. & Kalapothakis, E., 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Molecular ecology resources*, 8(5), pp.1078–80.
- Pegg, G.G. et al., 2006. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. *Scientia Marina*, 70(oct 2), pp.7–12.
- Ratnasingham, S. & Heber, 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.bacodingoflife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7(1), pp.355–364.
- Reynalte-Tataje, D.A. et al., 2012. Spatial and temporal variation of the ichthyoplankton in a subtropical river in Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 94(2), pp.403–419.
- Rizzo, E. et al., 2002. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 61(3), pp.615–632.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.
- Ward, R.D. et al., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360, pp.1847–1857.
- Wiegand, M., 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 286, pp.259–286.

Capítulo 2

Identificação molecular de embriões e larvas de peixes (Teleostei: Osteichthyes) do médio rio Paranapanema, bacia do alto Rio Paraná

Wilson Frantine-Silva¹, Silvia Helena Sofia¹, Mário Luis Orsi², Fernanda Simões de Almeida¹

RESUMO

A quantificação e classificação do ictioplâncton é uma das metodologias mais eficientes para o monitoramento do processo de recrutamento em peixes, no entanto, sua correta identificação é extremamente complexa, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento. O presente trabalho demonstra a eficácia da abordagem DNA *barcoding* na identificação do ictioplâncton na porção média do rio Paranapanema, localizado em uma das regiões mais impactadas por empreendimentos hidrelétricos do Brasil. Análises de distância genética a partir de sequências do gene CO1, variando entre 628-654pb, possibilitaram a identificação de 99,25% das 536 amostras de ovos (293) e larvas (243) submetidas à análise, resultando em 37 espécies distribuídas em 27 gêneros, 15 famílias e quatro ordens. A identificação molecular possibilitou a inclusão de dados proveniente de amostras de ovos as quais foram responsáveis por mais de 30% da riqueza observada. Os resultados contidos neste estudo comprovam a eficácia da metodologia DNA *barcoding* na identificação do ictioplâncton e demonstram como os dados gerados a partir dessa metodologia fornecem informações únicas para a elaboração de planos de conservação e manejo em reservatórios.

Palavras-chave: Ictioplâncton, DNA *barcoding*, mtDNA, recrutamento

Este manuscrito será submetido à *Neotropical Ichthyology* na forma de artigo regular

¹ Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia Geral.

² Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados, Departamento de Biologia Animal e Vegetal

Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380; Campus Universitário, CCB, CEP: 86.057-970, Londrina-PR, Brasil. wilsonfrantine@gmail.com; fernandasa@uel.br

INTRODUÇÃO

A crescente demanda energética mundial impele os países a buscar fontes de energia que sustentem seu desenvolvimento econômico e industrial. No Brasil, Usinas Hidrelétricas constituem a principal fonte energética e corresponderam a 76,9% dos 592Thw produzidos no país em 2013 (EPE, 2013). De acordo com Agostinho *et al.* (2008) a região da bacia do Alto rio Paraná apresenta maior incidência de empreendimentos hidrelétricos do país e conseqüentemente é a região que mais sofre com seus impactos. Um exemplo desta situação é o rio Paranapanema que atualmente é fragmentado por 11 Usinas Hidroelétricas formando um complexo sistema de reservatórios em cascata (Duke Energy, 2008). Dentre os inúmeros impactos causados à fauna de peixes, o bloqueio de rotas migratórias e os impactos causados pela regulação do fluxo de cheias são as mais drásticas modificações em relação ao processo de recrutamento das espécies de peixes e colocam em sério risco a sustentabilidade dessas populações (Agostinho *et al.*, 2004; Sanches *et al.*, 2006; Antonio *et al.*, 2007).

Estudos sobre ictioplâncton fornecem importantes informações sobre a biologia reprodutiva das espécies, bem como locais e épocas preferenciais para reprodução, possíveis rotas migratória e sucesso de recrutamento (Baumgartner *et al.*, 2004; Bialezki *et al.*, 2005; Reynalte-Tataje *et al.*, 2011). Essas informações são extremamente importantes para monitoramentos ecológicos, análises de impactos ambientais e desenvolvimento de planos de manejo e conservação. No entanto, a correta identificação ao nível de espécie é bastante complexa ou mesmo inviável, mesmo para taxonomistas experientes, uma vez que a maior parte das descrições de espécies envolve apenas indivíduos adultos (Pegg *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2013). A análise da composição das assembleias de ictioplâncton torna-se ainda mais complexa quando se considera a grande diversidade da ictiofauna na região neotropical, onde a classificação e identificação em algumas famílias como Loricariidae e Characidae é

extremamente complexa, mesmo entre indivíduos adultos (Armbruster, 2004; Lévêque *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2011).

Tradicionalmente a identificação de ovos e larvas de peixes emprega a análise de caracteres morfológicos como pigmentação, formas e estruturas presentes no corpo ou variação merística (Nakatani *et al.*, 2001). Contudo, essas estruturas nem sempre estão presentes nas fases iniciais do desenvolvimento ou ainda não apresentam diferenças, principalmente em ovos, que por vezes representam a maior parcela do ictioplâncton amostrado (Reynalte-Tataje, *et al.*, 2012; Baumgartner *et al.*, 2004).

Há aproximadamente dez anos Hebert *et al.* (2003a) propuseram um sistema de bioidentificação baseado na padronização de uma sequência de DNA mitocondrial (DNAmt) para discriminar todas ou a maior parte das espécies animais. Estes autores elegeram um trecho de aproximadamente 650pb na porção 5' do gene citocromo *c* oxidase subunidade I (Cox1 ou CO1) como segmento padrão de sua proposta baseados na baixa variação intraespecífica e alta variação interespecífica para essa região (Hebert *et al.*, 2003b). Desde então um grande banco de dados exclusivo para abrigar sequências deste e outros genes voltados à identificação molecular foi criado. Atualmente, mais de 2,4 milhões de espécimes encontram-se depositadas no *Barcode of Life Data Systems* (BOLD Systems), dentre os quais 13535 pertencem a espécies de peixes (ver www.boldsystem.org) (Ratnasingham & Heber, 2007). Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência da metodologia DNA *barcoding* na discriminação de espécies (Hebert *et al.*, 2004; Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2009), mesmo frente a uma fauna megadiversa com radiação recente como no caso dos peixes da região Neotropical (Carvalho *et al.*, 2011; Pereira, *et al.*, 2011; 2013).

Neste contexto, o presente estudo objetivou analisar a eficácia da metodologia DNA *barcoding* na identificação de ovos e larvas de peixes coletados no médio rio Paranapanema, visando validar o uso desta ferramenta para identificação de ovos e larvas de peixes da bacia

do alto rio Paraná, incrementando as informações disponíveis sobre o recrutamento das populações de peixes residentes, seus padrões de distribuição e reprodução.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem do ictioplâncton

O rio Paranapanema é um importante tributário da bacia do Alto rio Paraná, localizado na região mais impactada por empreendimentos hidroelétricos do país (Agostinho *et al.*, 2008). Ao longo de seu percurso, o rio Paranapanema atinge sua foz cerca de 660km após sua nascente, dos quais 329,9 km demarcam a divisa entre os estados de São Paulo ao norte e Paraná ao sul (Figura 1) (Maack, 2002).

As amostragens foram realizadas entre novembro de 2012 e março de 2013, na zona fluvial dos reservatórios de Canoas I e II, e em cinco localidades na região de influência do reservatório de Capivara (Figura 1). Foram utilizadas redes cônicas de malha 0,5mm e 1,6m de comprimento acopladas a um fluxômetro mecânico para medir a quantidade de água filtrada. As redes permaneceram cerca de 20 cm abaixo da superfície da água até o fim do tempo de cada amostragem. A densidade de ovos e larvas foi padronizada para 10m³ de acordo com Nakatani *et al.* (2001).

Ainda em campo as amostras foram imediatamente armazenadas álcool 98% com proporção igual ou superior a três quartos de álcool para uma da amostra e posteriormente estocada à -20°C. Em laboratório as amostras foram triadas e agrupadas como ovos ou larvas e identificados ao menor nível taxonômico possível de acordo com Nakatani *et al.* (2001), visando definir grupos de menor tamanho para seleção de amostras a serem submetidas às análises genéticas. Até trinta amostras de ovos ou larvas foram aleatoriamente selecionadas por ordem e por amostragem.

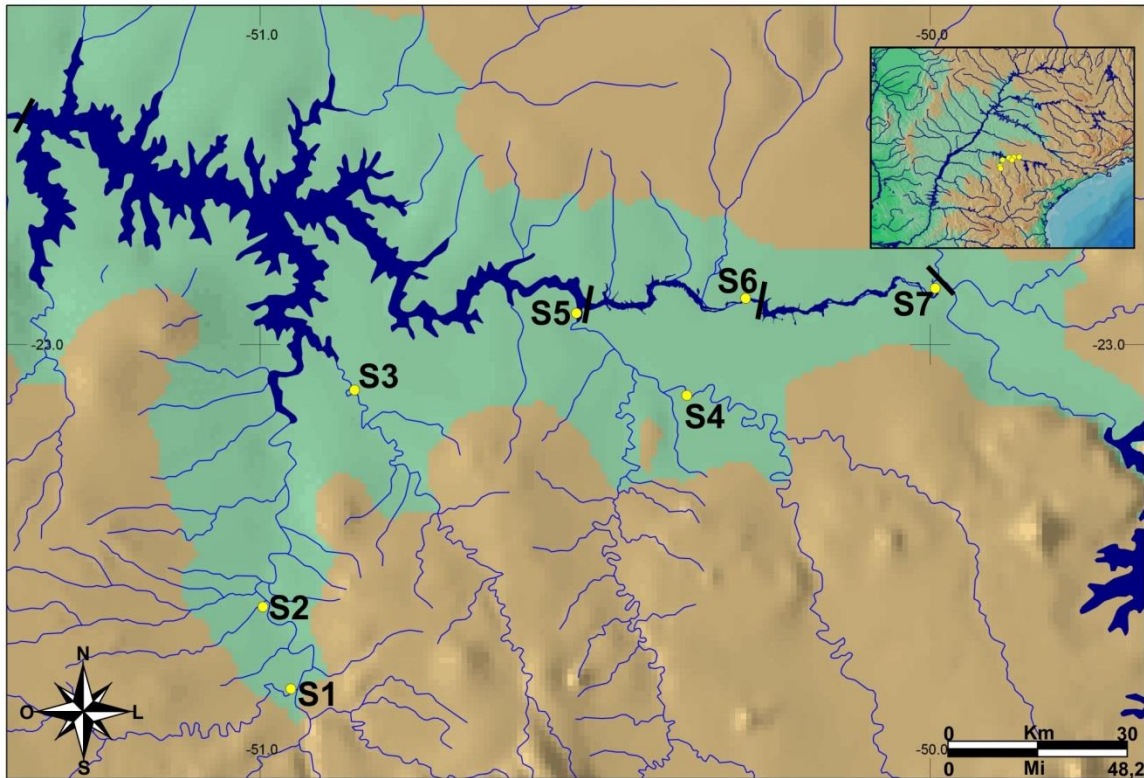


Figura 2.1: Distribuição dos pontos de coleta ao longo da porção média do rio Paranapanema. Pontos em amarelo demarcam os sítios de amostragem: S1-Rio Taquara (23°30'48.49"S; 50°57'15.02"O); S2-Rio Apertados (23°23'28.05"S; 50°59'45.08"W); S3-Rio Congonhas (23°04'04.31"S; 50°51'32.56"); S4-médio Rio das Cinzas (23° 4'33.31"S 50°21'47.22"O); S5- baixo Rio das Cinzas (22°57'12.12"S 50°31'40.24"O); S6-Canoas I (22°56'17.10"S; 50°17'21.32"O); S7-Canoas II (22°54'58.29"S 49°59'32.83"O). As linhas sólidas pretas demarcam as barragens das usinas hidroelétricas (UHEs) no rio Paranapanema, da esquerda para direita: UHE Capivara, UHE Canoaas I, UHE Canoaas II, UHE Salto Grande.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

As extrações seguiram o protocolo descrito por Silva e Almeida (2013 – dados ainda não publicados - ver capítulo 1). O gene citocromo *c* oxidase CO1 (648pb) foi amplificado utilizando os *primers* descritos por Ward *et al.* (2005) FishF1- 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3' e FishR1- 5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3' em termociclador MJ Research PTC -100, com desnaturação inicial de 5 min à 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30s, 54°C por 30s e 72°C por 1min, com extensão final de 10min à 72°C. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 10µL com 1x de PCR Master Mix (Promega), 0,4µM dos *primers* FishF1 e FishR1, 15ng DNA e água para completar o volume. Os produtos resultantes da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% (2µL de amostra/2µL ficol+azul de bromofenol),

corados com 0,08 μ L/mL de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies). Após visualização, o restante do produto amplificado foi purificado com adição de 0,5 μ L de ExoStar™ 1-Step (Illustra™) seguindo recomendações do fabricante. As amostras tiveram as duas fitas sequenciadas em reações independentes, de acordo com o protocolo descrito por Hajibabaei *et al.* (2005). O produto das reações de sequenciamento foi analisado em sequenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems Inc., CA, USA).

Qualidade e análise dos dados moleculares

Os produtos de PCR (~680pb) originados a partir das amostras de ovos e larvas bem como suas respectivas sequências, de ambas as fitas *forward* e *reverse*, com tamanho superior a 600pb foram combinadas para formação de um consenso através do aplicativo online Electropherogram Quality Analysis (Togawa & Brigido, 2003).

As sequências foram submetidas ao banco de dados BOLD (Ratnasingham & Heber, 2007) (<http://www.boldsystems.org/>) no qual a ferramenta BOLD-IDS foi utilizada para verificar a correspondência e similaridade das sequências submetidas com as armazenadas no banco de dados, as quais foram consideradas significativas às correspondências superiores a 98% com distância intraespecífica inferior a 2%. As sequências com as melhores correspondências para cada táxon foram incorporadas às análises de distância genética intraespecífica e interespecífica baseado no modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980). O mesmo modelo foi aplicado para a construção da árvore de distância com método Neighbor-Joining (NJ) visando uma representação gráfica da distribuição das distâncias genéticas entre os táxons. As análises de distância e a árvore de Neighbor-Joining foram feitas através do programa MEGA v5.0 (Tamura *et al.*, 2011). As distâncias genéticas para definir os níveis de espécie, gênero e família foram baseadas em Pereira *et al.* (2011, 2013).

RESULTADOS

Identificação molecular e distância genética

A partir da correspondência entre as sequências das amostras analisadas e as sequências dos adultos disponíveis no banco de dados foi possível identificar em nível de espécie 535 das 536 amostras (99,81%). Entre as 536 amostras analisadas, apenas a sequência PDCAI233 apresentou valores de similaridade inferior a 99% impedindo a identificação direta desta amostra ao nível de espécie. Para as demais 535 amostras os valores de similaridade entre as sequências analisadas e as sequências dos adultos disponíveis nos bancos de dados se mantiveram acima de 99% (ver Apêndice 3).

Todos os fragmentos amplificados foram maiores que 600pb e as respectivas sequências, em ambos os *primers*, apresentaram boa qualidade, sem evidências de inserções, deleções ou códons de parada. A distribuição das distâncias genéticas K2P entre diferentes níveis taxonômicos demonstra o aumento da distância genética de acordo com o aumento do nível taxonômico, variando entre 0% e 1,25% (média 0,17%), para as comparações intraespecíficas, e entre 6,34% e 8,7% (média de 7,09%) para as comparações congênicas (Tabela 1). Estes dados estabelecem um intervalo de cinco vezes o valor da menor distância genética intraespecífica em relação à menor distância genética interespecífica.

Tabela 2.1: Distribuição das frequências relativas das distâncias genéticas K2P intraespecíficas e interespecíficas. E.P. = erro padrão.

Comparação	Táxons	Dist. min.	Dist. méd.	Dist. max.	E.P.
Dentro de espécies	26	0	0,41	1,25	0,07
Dentro de gêneros	37	6,34	7,09	8,70	0,40
Dentro de famílias	14	10.54	24.70	26.60	0.20
Dentro de ordens	4	22.70	25.10	35.60	0.49

Foram considerados apenas os grupos com mais de um táxon.

A árvore NJ-K2P resumida (Figura 2) aponta a formação de grupos terminais bem definidos, com baixa distância entre as amostras identificadas ao nível de espécie, além de altos índices de sustentabilidade dos ramos (ver árvore completa no apêndice 4). Para complementar os resultados apresentados pela árvore NJ-K2P, a análise de distância para o

táxon mais próximo (*Nearst Neighbor Distance* NND) foi realizada para mensurar a distância entre os táxons relacionados. A menor distância encontrada para a análise NND foi observada entre *Hypostomus regani* e *Hypostomus strigaticeps* ($D = 3,9 \pm 0,75$).

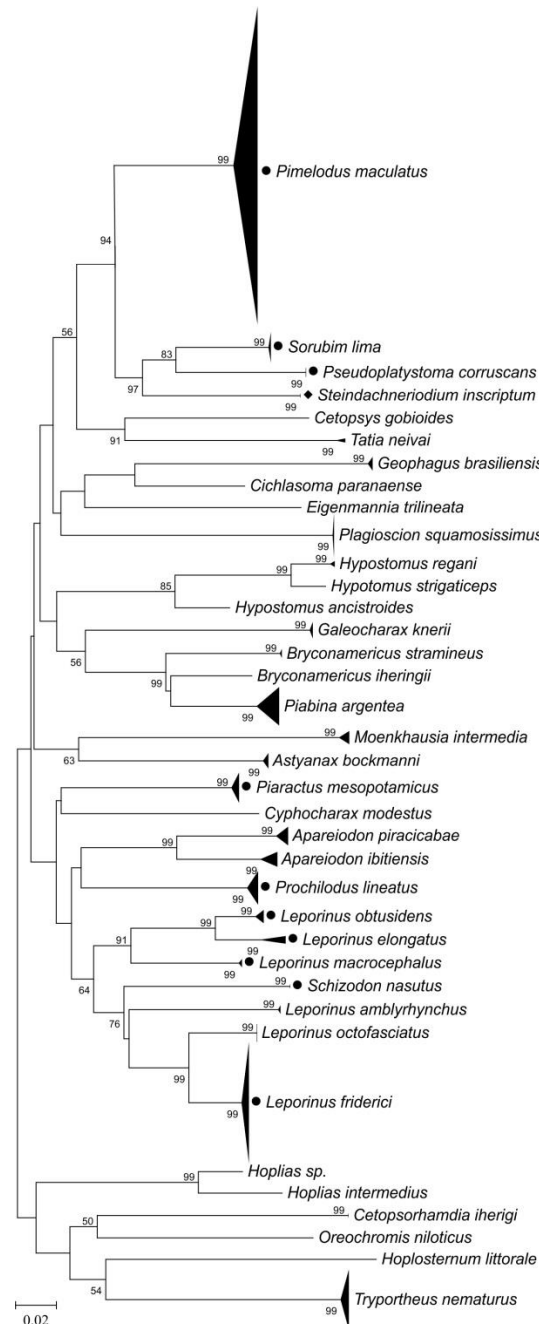


Figura 2.2: Representação gráfica de distância genética K2P. Distância genética entre as sequências das 536 amostras estimada com base no modelo Kimura-2-Parâmetros agrupada pelo método Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através do software MEGA v5.0. Táxons marcados com um ponto preto correspondem a espécies migradoras segundo Agostinho *et al.* (2003); táxons com losango preto correspondem à espécie migradora ameaçada de extinção. Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada bifurcação, valores inferiores a 50% são ocultados. Os táxons terminais correspondentes a indivíduos da mesma espécie foram agrupados. Os nomes dos grupos em itálico indicam a correspondência ao menor nível taxonômico possível.

Ictioplâncton: densidade, abundância e composição taxonômica

Ao longo do período de estudo foram coletadas 6897 amostras, das quais 5849 (84,8%) correspondem a ovos e 1048 (15,2%) correspondem a larvas. A maior densidade de ovos foi observada para o médio rio das Cinzas, enquanto o rio Taquara apresentou a menor densidade, uma vez que não foram coletadas amostras de ovos neste local (Figura 3-D).

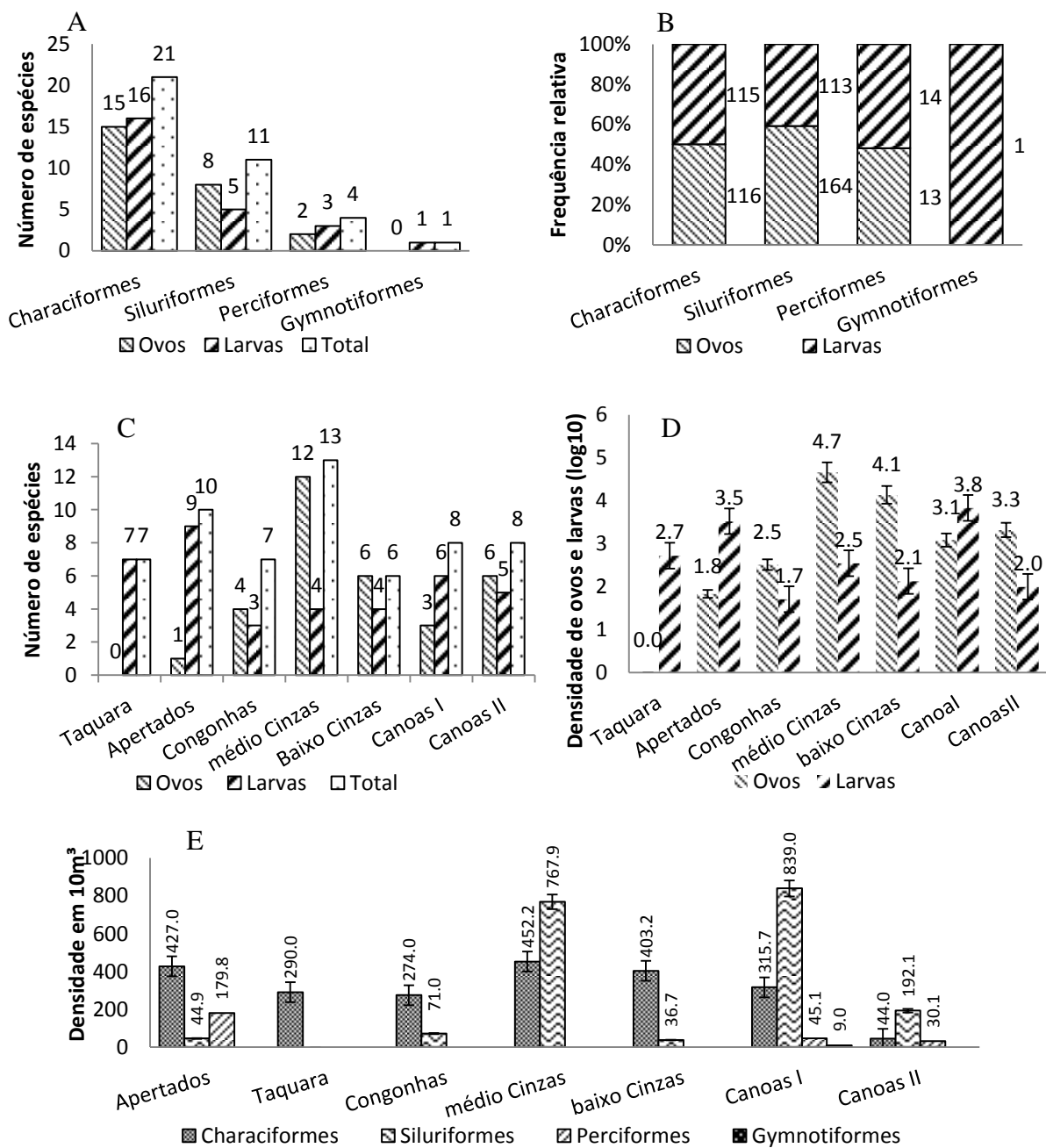


Figura 2.3: Densidade e número de espécies das amostras de ovos e larvas por localidade ao longo do médio rio Paranapanema. A - densidade de ovos e larvas por 10m³ (Log10); **B** - número de espécies identificadas entre ovos e larvas em cada localidade. **C** - distribuição da densidade de ovos e larvas entre as ordens por localidade; **D** - frequência relativa de amostras analisadas por localidade (dados considerando todas as amostras e sem identificação molecular); **E** - frequência relativa das amostras por ordem.

Com base na análise de similaridade das sequências de 536 amostras em relação às sequências dos adultos disponíveis no BOLD Systems Data Base, foram identificadas 37 espécies, distribuídas em 27 gêneros, 15 famílias e quatro ordens (Tabela 2.2), a partir de 9 morfotipos previamente estabelecidos para ovos e larvas (Figura 2.4).

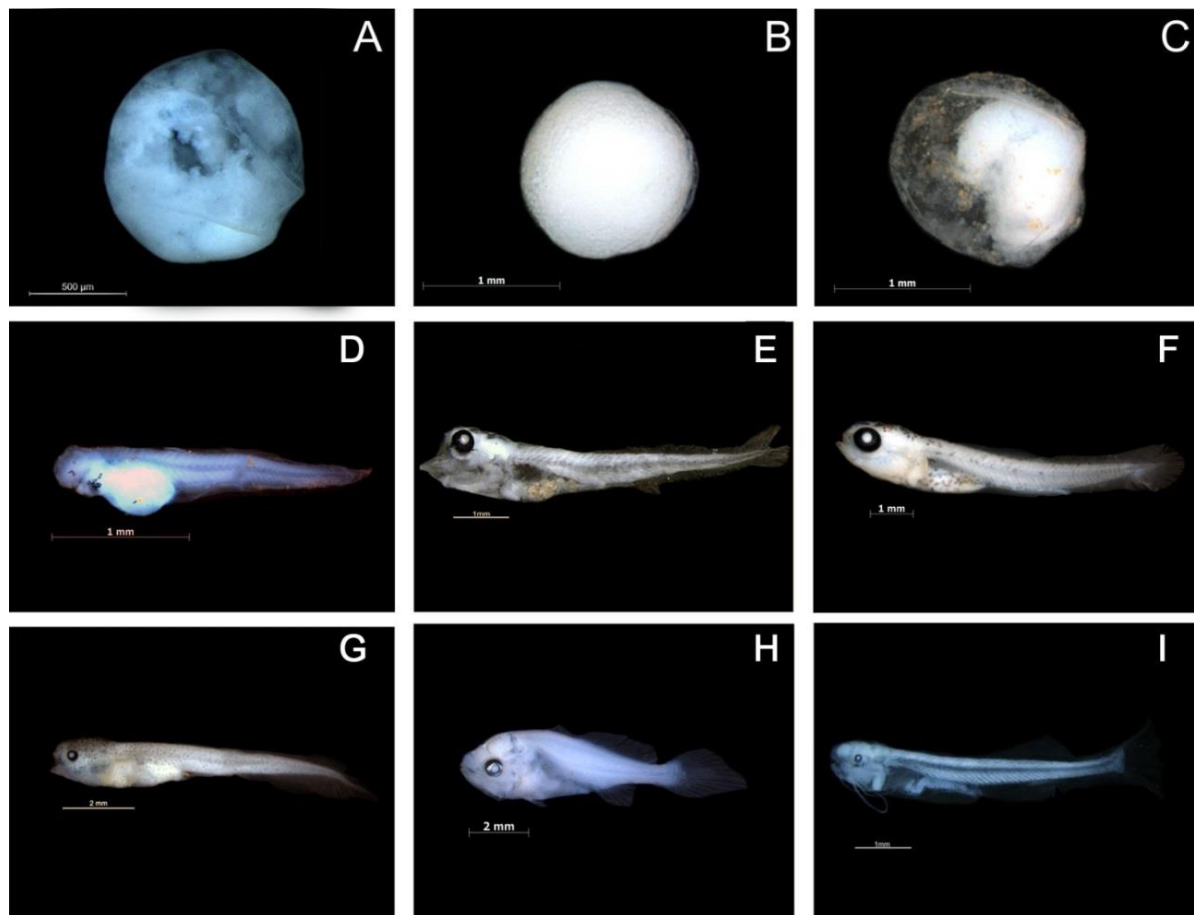


Figura 2.4: Morfotipos de ovos e larvas definidos à priori. Quadros “A” (*S. nasutus*-PDCAI101), “B” (*Hoplias sp.*-PDCAI233) e “C” (*P. maculatus*-PDCAI105) três morfotipos de ovos encontrados; “D” *Incertae Sedis*-PDCON07, “E” *L. friderici*-PDCAI144, “F” *H. intermedius*-PDCON33; “G” *E. trilineata*-PDCAI161, “H” *P. squamosissimus*-PDCAI146, e “I” *P. maculatus*-PDCAI158, correspondem aos morfotipos referentes às quatro ordens que puderam ser identificadas previamente, “E-F” Characiformes, “G” Gymnotiformes, “H” Perciformes, “I” Siluriformes, em seus estágios mais avançados em relação às amostras capturadas.

A ordem Characiformes apresentou o maior número de espécies (21), tanto para ovos quanto para larvas, seguida pela ordem Siluriformes com 11 espécies. Três espécies identificadas pertencem à ordem Perciformes e uma amostra pertence à ordem Gymnotiformes. A ordem Siluriformes foi a mais abundante (53,15%), seguido por Characiformes (41,61%). Perciformes e Gymnotiformes juntos corresponderam a 5,16% do total de amostras analisadas.

1 **Tabela 2.2: Distribuição dos ovos e larvas de peixes identificados ao longo do médio rio Paranapanema.** (%) frequência relativa; N-
 2 frequência absoluta; L – quantidade de larvas (frequência absoluta/densidade em 10m³); O – quantidade de ovos (frequência absoluta/densidade
 3 em 10m³). *espécie médio ou longo deslocamento reprodutivo (Agostinho *et al.*, 2003).

Espécie	(%)	N	UHE Capivara										Canoas I		Canoas II	
			Rio Apertados		Rio Taquara		Rio Congonhas		Rio das Cinzas médio		Rio das Cinzas foz		L	O	L	O
			L	O	L	O	L	O	L	O	L	O				
<i>A. ibitiensis</i>	1,49	8	4/89,9	0	4/36,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. piracicabae</i>	1,87	10	3/67,5	0	7/63,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. bockmanni</i>	1,49	8	1/22,5	2/45	5/45,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. iheringii</i>	0,19	1	0	0	1/9,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. stramineus</i>	0,75	4	3/67,5	0	0	0	0	1/10,2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. gobioides</i>	0,19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/2,4	0
<i>C. iheringi</i>	0,37	2	0	0	0	0	20	2/20,3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. paranaense</i>	0,19	1	1/22,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. modestus</i>	0,19	1	0	0	0	0	0	0	10	1/8,6	0	0	0	0	0	0
<i>E. trilineata</i>	0,19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/9,1	0	0	0
<i>G. knerii</i>	1,49	8	0	0	1/9,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7/16,3
<i>G. brasiliensis</i>	1,31	7	7/157,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. intermedius</i>	0,19	1	0	0	0	0	10	1/10,2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hoplias sp</i>	0,19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/9,1		
<i>H. littorale</i>	0,19	1	0	0	0	0	1/10,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. ancistroides</i>	0,19	1	10	1/22,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. regani</i>	0,56	3	0	0	0	0	3/30,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. strigaticeps</i>	0,19	1	0	0	0	0	1/10,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. amblyrhynchus</i>	0,75	4	4/89,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. piavussu</i>	0,75	4	0	0	0	0	0	0	1/8,6	0	0	0	3/27,1	0	0	0
<i>L. friderici*</i>	11,93	64	0	0	3/27,2	0	0	0	8/68,3	14/119,5	3/36,7	7/85,6	27/243,6	0	2/4,7	0

Continuação tabela2.2

Espécie	%	N	UHE Capivara										Canoas I		Canoas II		
			Rio Apertados		Rio Taquara		Rio Congonhas		Rio das Cinzas médio		Rio das Cinzas foz		L	O	L	O	
			L	O	L	O	L	O	L	O	L	O					
<i>L. macrocephalus</i> *	0,75	4	0	0	0	0	0	0	0	40	4/34,2	0	0	0	0	0	0
<i>L. obtusidens</i> *	1,31	7	0	0	0	0	0	0	0	10	1/8,6	0	0	3/27,1	0	1/2,4	2/4,7
<i>L. octofasciatus</i>	1,87	10	0	0	0	0	0	2/20,3	2/17,1	6/51,2	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. intermedia</i>	1,31	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/7	4/9,3
<i>O. niloticus</i>	0,19	1	0	0	0	0	0	1/10,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. argentea</i>	3,92	21	10/224,8	0	11/99,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. mesopotamicus</i> *	2,99	16	0	0	0	0	0	0	0	5/42,7	4/48,9	7/85,6	0	0	0	0	0
<i>P. maculatus</i> *	45,7	245	0	0	0	0	0	0	20/170,7	52/443,7	0	0	51/460,1	41/369,9	36/83,4	45/104,2	0
<i>P. squamosissimus</i>	3,36	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/45,2	0	0	13/30,1	0
<i>P. lineatus</i> *	3,36	18	0	0	0	0	0	0	0	11/93,9	1/12,3	6/73,4	0	0	0	0	0
<i>P. corruscans</i> *	0,93	5	0	0	0	0	0	0	0	5/42,7	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. nasutus</i> *	0,37	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2/18,1	0	0	0
<i>S. lima</i>	2,61	14	0	0	0	0	0	0	0	12/102,4	0	1/12,3	0	0	0	1/2,4	0
<i>S. scriptum</i> *	0,37	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2/24,5	0	0	0	0	0
<i>T. neivai</i>	0,37	2	1/22,5	0	0	0	0	0	0	1/8,6	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. nematurus</i>	5,97	32	0	0	0	0	0	25/253,7	0	2/17,1	3/36,7	2/24,5	0	0	0	0	0
Total/Densidade 10m³			34/764,0	3/67,4	32/290,1	00	5/50,7	32/324,7	31/264,5	114/972,7	11/134,4	25/305,4	90/811,9	44/396,9	43/99,5	72/166,7	

Em quatro das sete localidades a ordem Characiformes foi mais abundante (rio Apertados, rio Taquara, rio Congonhas e baixo rio das Cinzas), enquanto à ordem Siluriformes apresentou o maior número de capturas nas demais localidades, (médio rio das Cinzas, Canoas I e Canoas II).

Não houve diferenças expressivas entre a participação de ovos e larvas dentre as diferentes ordens. Dentre os Characiformes ovos e larvas representam respectivamente 50,22% e 49,78% das amostras analisadas, para Siluriformes 59,2% e 40,8% e Perciformes 48,14% e 51,86%. Apenas uma amostra no estágio larval foi identificada para a ordem Gymnotiformes (Figura 3-b).

As maiores densidades de ovos foram registradas na região média e baixa do rio das Cinzas enquanto as maiores densidades de larvas foram observadas no reservatório de Canoas I e rio Apertados. A região do baixo rio das Cinzas apresentou também o maior número de espécies (13 spp.) das quais 12 foram identificadas entre as amostras de ovos. A identificação molecular revelou um grande número de espécies restritas a amostras de ovos, 29,73% (11 spp.) em relação às 37 espécies identificadas.

DISCUSSÃO

Eficiência da identificação de ovos e larvas

O presente trabalho prove pela primeira vez informações sobre a distribuição e composição taxonômica das assembleias de ictioplâncton em águas continentais na região neotropical com base na metodologia DNA *barcoding*, analisando a contribuição de ovos na composição taxonômica destas assembleias.

Os resultados confirmam a eficiência da metodologia DNA *barcoding*, identificando 99,81% das amostras analisadas em nível de espécie e 100% das amostras em nível de gênero, como tem sido demonstrado por outros trabalhos envolvendo identificação molecular de ovos e larvas marinhos (Pegg *et al.*, 2006; Hubert *et al.*, 2010; Ko *et al.*, 2013) e discriminação da

ictiofauna de peixes neotropicais (Pereira *et al.*, 2011; 2013), estendendo os resultados para identificação de produtos reprodutivos das espécies de peixes desta região. Os dados também apontam um elevado índice de identificação para táxons que comumente não são identificados morfológicamente dentre amostras de ictioplâncton, como as famílias Anostomidae, Characidae e Loricariidae, fornecendo informações críticas para ações de manejo (Castro *et al.*, 2002; Reynalte-Tataje *et al.*, 2012).

A eficiência da identificação pelo DNA *barcoding* se baseia no conceito *barcoding gap*, que corresponde à diferença entre as distâncias genéticas intra e interespecíficas (Hebert, *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004). A baixa distância genética intraespecífica (máximo 1,25%) em comparação à alta distância genética interespecífica (mínimo 6,34%) indicam um claro *barcoding gap* de cinco vezes o valor da maior distância genética interespecífica, corroborando os resultados encontrados por Pereira *et al.* (2013) para os peixes da bacia do alto rio Paraná, que encontrou uma distância intraespecífica média de 1,3%.

Os índices de similaridade entre sequências de ovos, larvas e adultos (Banco de dados) possibilitaram a identificação de 99,81% das amostras analisadas demonstrando ser a metodologia mais abrangente para identificação molecular de espécies, como já observada por Ward *et al.* (2009). Estes dados aliados à distribuição de distância genética denotam um alto nível de confiabilidade na identificação das amostras.

No entanto, para um dos casos, o índice de similaridade se mostrou insuficiente para identificar diretamente a amostra em nível de espécie. A sequência PDCAI233, identificada como *Hoplias sp.*, apresentou um índice de similaridade em relação às sequências dos adultos depositados no banco de dados igual a 96,27% (*Hoplias intermedius* - JN988905.1) (Anexo 3). A baixa similaridade entre essas sequências também pode ser observada na distribuição das distâncias genéticas K2P na árvore de NJ (Figura 2.2), e análise de distância para o táxon mais próximo (NND, Apêndice 3), onde foi possível observar valores de distâncias maiores

que 3,5% entre a sequência correspondente à PDCAI233 (*Hoplias sp.*) e o táxon mais próximo, tanto em comparação com o presente estudo quanto em comparação com amostras presentes no banco de dados.

Pereira *et al.* (2013) também observaram elevados índices de distância intraespecífica para *H. intermedius* (>2%), levantando a hipótese de haver mais de uma unidade taxonômica dentro desta espécie. Embora *Hoplias intermedius* seja reconhecida como única espécie do grupo *H. Lacerda* autóctone para bacia do alto rio Paraná (Oyakawa & Mattox, 2009), não é possível descartar a hipótese de que a amostra identificada como *Hoplias sp.* pertença à outra espécie já descrita para o gênero, o que só poderá ser confirmado através da comparação com amostras para as demais espécies pertencentes ao gênero. Vale ressaltar que o gênero *Hoplias* é considerado um complexo de espécies devido à grande diversidade cariotípica presente dentro do grupo e que o mesmo deve ser investigado com maior cautela para averiguar o real status taxonômico das espécies deste grupo na bacia do alto rio Paraná (Vicari *et al.*, 2006; Ferreira, *et al.*, 2007).

A técnica de DNA *barcoding* mostrou-se especialmente eficiente para correta identificação de táxons que frequentemente apresentam problemas na identificação morfológica em suas fases iniciais de desenvolvimento, como no caso da família Anostomidae, que apresenta um alto nível de complexidade para identificação de amostra de ictioplâncton, estando frequentemente entre as amostras identificáveis apenas em nível de família (Bialetzki *et al.*, 2005; Reynalte-tataje *et al.*, 2011; Kipper *et al.*, 2011) (Figura 4-d). No presente trabalho foram identificadas sete espécies pertencentes à família Anostomidae: *Leporinus amblyrhynchus*, *Leporinus piavussu*, *Leporinus friderici*, *Leporinus macrocephalus*, *Leporinus obtusidens*, *Leporinus octofasciatus* e *Schizodon nasutus* com alto nível de confiabilidade. Várias espécies da família Anostomidae apresentam deslocamentos reprodutivos de curta ou longa distância, sendo fortemente afetadas pelo atual cenário de

fragmentação das bacias hidrográficas (Agostinho *et al.*, 2003; 2008; Makrakis *et al.*, 2012). Deste modo, obter informações precisas sobre a dinâmica reprodutiva de cada espécie é imprescindível à sua conservação.

Riqueza de espécies com base em análises moleculares

A pesar da grande importância para a avaliação das populações naturais de peixes, estudos com ictioplâncton são pouco frequentes, muito devido à dificuldade de identificação de ovos e larvas, mas principalmente frente à ictiofauna megadiversa da região neotropical (Nakatani *et al.*, 2001; Agostinho *et al.*, 2005). No presente trabalho foi possível distinguir 37 espécies (25 foram entre ovos e 26 entre larvas) a partir de apenas nove morfotipos, três referentes a ovos e seis de larvas.

A eficiência da identificação molecular de ovos e larvas de peixes em relação aos métodos morfológicos já é documentada para espécies marinhas. Em um trabalho avaliando a eficácia da identificação morfológica do ictioplâncton marinho em relação à identificação molecular Ko *et al.* (2013) constataram que apenas 13,5% das amostras enviadas a cinco diferentes laboratórios foram identificadas em nível de espécie utilizando caracteres morfológicos, em contrapartida cerca de 80% dessas larvas puderam ser identificadas em nível de espécie com por meio do DNA *barcoding*.

A identificação molecular também possibilitou a inclusão dos dados provenientes de amostras de ovos para composição da riqueza de espécies. Apenas dentre as amostras de ovos foram encontrados 11 espécies não presentes entre as amostras de larvas (29,75% da riqueza total). Comumente os dados provenientes de amostras de ovos são avaliados para determinar áreas de desova através da variação de densidade entre localidades (Baumgartner *et al.*, 2004; Kipper *et al.*, 2011; Reynalte-Tataje, *et al.*, 2012). No entanto, devido à impossibilidade de identificação em nível de espécie, na maioria dos casos, avaliações mais detalhadas acerca de sítios específicos de reprodução tornam-se inviáveis. Por exemplo, *Steindachneriodion*

scriptum, uma espécie ameaçada de extinção (Oyakawa & Menezes, 2011), apresentou registro apenas para região média do rio das Cinzas, apontando esta região como um ponto crítico para conservação desta espécie.

A comparação dos dados de riqueza entre as localidades também demonstram a importância da análise de ovos na composição taxonômica das assembleias de ictioplâncton. O sítio de amostragem localizado na região média do rio das Cinzas (S4-Figura 1) apresentou o maior número de espécie (13 spp.), das quais 12 ocorreram entre as amostras de ovos e oito correspondem a espécies com deslocamento reprodutivo de longa distância (Agostinho *et al.*, 2003) (Tabela 2). Caso estes dados não fossem analisados, a região do médio rio das cinzas apresentaria apenas quatro espécies, o que poderia alterar a ordem de prioridade desta região para conservação.

A importância destes dados torna-se ainda maior considerando a alta frequência amostral de ovos dentre as amostras de ictioplâncton capturadas. Baumgartner *et al.* (2004) em um estudo na porção alta do rio Paraná e no reservatório da UHE de Itaipu verificou uma frequência de cerca de 60% de ovos dentre todo o ictioplâncton coletado, enquanto Reynalte-Tataje *et al.* (2012) em um estudo avaliando a distribuição temporal e espacial do ictioplâncton na bacia do rio Uruguai verificaram que 94,6% de toda sua amostragem eram ovos.

Deste modo, é recomendável que futuros estudos sobre a distribuição e composição das assembleias de ictioplâncton incluam análises moleculares para identificação das espécies provenientes de amostras de ovos.

Densidade, abundância e composição taxonômica

A partir da correta identificação molecular é possível delimitar com maior precisão os locais que servem à desova, crescimento e forrageamento de larvas das espécies de peixes. No presente estudo sequências de 536 amostras resultaram na identificação de 37 espécies

distribuídas em 27 gêneros, 15 famílias e quatro ordens, correspondendo a 23,87% das espécies de peixes descritas para o rio Paranapanema (Hoffmann *et al.*, 2005; Shibatta *et al.*, 2008; Galves *et al.*, 2009; Orsi 2010).

As assembleias de ovos e larvas nos ambientes estudados foram compostas principalmente por Characiformes e Siluriformes. Este padrão foi observado por Vianna & Nogueira (2008) para o rio das Cinzas e Orsi (2010) no reservatório de Capivara, onde foi observado a dominância de Characiformes em regiões lóticás, seguidos por Siluriformes e Perciformes em áreas semilóticas e lênticas.

No presente estudo a ordem Characiformes foi mais abundante em todas as regiões com características lóticas (rio Apertados, rio Taquara, rio Congonhas e baixo rio das Cinzas). Apenas na porção média do rio das Cinzas a ordem Siluriformes foi mais abundante se assemelhando com pontos com menor velocidade de água (Canoas I e Canoas II). No entanto, nestes ambientes com menor velocidade de água, a densidade de capturas tanto de ovos quanto para larvas foi fortemente influenciado pela alta frequência de captura de *Pimelodus maculatus*, o qual apresentou as maiores densidades de ovos e larvas.

Em parte, a grande abundância desta espécie pode estar relacionada com sua estratégia reprodutiva. *P. maculatus* se enquadra como espécie de curto deslocamento reprodutivo, alta produção de ovócitos e grande taxa de fecundidade (Agostinho *et al.*, 2003; Orsi 2010). Estas características podem ter modulado a permanência de algumas espécies no reservatório.

Outro exemplo deste possível sucesso de colonização é a espécies *Leporinus friderici*, que apresenta características reprodutivas semelhantes às descritas acima para *P. maculatus*. *L. friderici* apresentou a segunda maior abundância (11,93%) especialmente no reservatório de Canoas I, onde também foi encontrado as maiores densidades de *P. maculatus*. Juntos *L. friderici* e *P. maculatus* representaram 57,63% do total de capturas.

Por outro lado, a baixa frequência nas capturas de Perciformes, principalmente da família Cichlidae, pode estar associada ao comportamento de construção de ninhos ou outros cuidado com a prole, comportamentos também observados para algumas espécies da ordem Gymnotiformes (*Eigenmannia spp.*) e entre algumas espécies da ordem Siluriformes, como no caso da família Loricariidae (*Hipostomus spp.*) e Heretrinidae (*Hoplias spp.*), dificultando a captura destas espécies dentre amostra de ictioplâncton (Goodwin *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000; Agostinho *et al.*, 2003; Crampton & Hopkins, 2005; Prado *et al.*, 2006).

As menores densidades, abundâncias e frequências relativas de captura foram observadas para espécies da ordem Gymnotiformes: *Eigenmannia trilineata*, Perciformes: *Cichlassoma paranaense* e *Oreochromis niloticus*, bem como para espécies da ordem Siluriformes: *Cetopsys gobiodes*, *Cetopsorhamdia iheringii*, *Hoplias spp.*, *Hoplosternum littorale*, *Hypostomus spp.*, *Steindachneriodon scriptum* e *Tatia neivai*, como também observado por Baumgartner *et al.* (2004), Bialetzki *et al.* (2005) e Reynalte-Tataje *et al.* (2012).

Embora a amostragem entre o ictioplâncton seja menos expressiva, espécies pertencentes principalmente à ordem Perciformes podem apresentar grande sucesso na permanência em áreas lânticas devido a estratégias reprodutivas diferenciadas (Orsi, 2010). Suzuki, (1999) ressalta que, de forma geral, os ambientes que se formam após a construção de barragens são naturalmente ocupados pela ictiofauna original, mas esta ocupação depende da capacidade da ictiofauna local de se ajustar às novas condições ambientais, uma vez que de acordo com Lopes *et al.* (2000) as mudanças nas estratégias reprodutivas provem mais de ajustes ecológicos do que fenômenos genéticos.

Dentre as espécies de Characiformes, constantemente amostrados em trabalhos com ictioplâncton devido às características de ovos e larvas (Vono *et al.*, 2002; Kipper *et al.*,

2011), as menores densidades foram registradas para as espécies *Bryconamericus iheringii*, *Cyphocharax modestus* e *Schizodon nasutus*.

Em especial, as características reprodutivas de *Schizodon nasutus* são semelhantes à de espécies com maior densidade (*L. fridericii* e *P. maculatus*) (Orsi, 2010) e indicam que a baixa densidade de ovos para esta espécie pode estar associada a outros fatores além de suas estratégias reprodutivas.

A falta de condições adequadas para a reprodução da espécie e principalmente a baixa densidade de adultos em condições de reprodução, influenciada pela alteração do ambiente, podem alterar as taxas reprodutivas da espécie (Baumgartner *et al.*, 2008). Dados apresentados por Britto & Carvalho (2013), em um trabalho avaliando os movimentos reprodutivos de algumas espécies nos reservatórios de Capivara, Canoas I e Canoas II, apontam uma baixa recaptura para *Schizodon nasutus*, indicando que esta espécie teria dificuldades de permanência em ambientes impactados e manteriam populações com menor número de indivíduos.

Deste modo, assim como a baixa abundância de *Schizodon nasutus* pode ser decorrente de um insucesso da espécie no ajuste a esse novo ambiente, a maior abundância observada para *Pimelodus maculatus* (45,7%), pode estar relacionada ao melhor ajuste desta espécie as condições do reservatório em relação às demais espécies aqui observadas. No entanto, um estudo mais prolongado é necessário para encontrar padrões mais definidos em relação aos ajustes das estratégias reprodutivas destas espécies.

Ao longo deste estudo quatro espécies não nativas foram identificadas entre as amostras de ictioplâncton: *Oreochromis niloticus* (exótica) e *Tryportheus nematurus* (alóctone) no rio Congonhas, *Sorubim lima* (alóctone) no médio e baixo rio das Cinzas, *Plagioscion squamosissimus* (alóctone) nos reservatórios de Canoas I e Canoas II. Embora com baixa abundância observada entre amostras de ictioplâncton, estas espécies

frequentemente são coletadas entre amostras de indivíduos adultos, causando diversos impactos nos ambientes que ocupam (Agostinho *et al.*, 1993; Orsi, 2010).

Por outro lado, espécies nativas que apresentam longos deslocamentos reprodutivos comumente são as mais afetadas pela fragmentação dos sistemas hidrográficos (Antonio *et al.*, 2007b). Os resultados indicam que espécies migradoras acumularam-se em zonas lóxicas dos reservatórios, principalmente nas porções média e baixa do rio das Cinzas (Tabela 2). Este padrão também foi observado por Vianna & Nogueira (2008) e Reynalte-Tataje *et al.* (2012), no entanto, estes autores salientam que a atividade reprodutiva destas espécies está sujeita a condições limnológicas bastante específicas e pouco frequentes. Deste modo, locais que apresentem as mínimas condições de reprodução para estas espécies devem se tornar prioridades para conservação.

Os resultados apresentados confirmam as altas taxas de sucesso na identificação molecular já documentado em outros trabalhos, estendendo os resultados para amostras de ictioplâncton. Os dados gerados a partir da metodologia DNA *barcoding* se mostram especialmente úteis na identificação de táxons com classificação complexa a partir de amostras de ictioplâncton, tais quais as espécies das famílias Anostomidae, Characidae e Loricariidae. Os resultados aqui apresentados demonstram que a identificação molecular possibilita a inclusão de ovos na análise da composição das assembleias ictioplanctônicas e que esses táxons podem ser exclusivamente encontrados dentre amostras de ovos. Portanto, abordagens moleculares para o estudo do ictioplâncton devem ser incluídas em futuras propostas de estudos para aumentar a acurácia dos resultados e fornecer informações mais precisas que resultem em planos de conservação igualmente precisos.

REFERÊNCIAS

- Agostinho, A. A., Gomes, L. C., Suzuki, H. I., & Julio Jr, H. F. (2003). Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin Brazil. In J. Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross, & A. Baer (Eds.), *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status* (1st ed., p. 361). Ottawa: International Development Research Centre.
- Agostinho, A. A., Gomes, L. C., Veri, S., & Okada, E. K. (2004). Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. *Fish Biology and Fisheries*, *14*, 11–19.
- Agostinho, A. A., Mendes, V., Suzuki, H., & Canzi, C. (1993). Avaliação da atividade reprodutiva da comunidade de peixes dos primeiros quilômetros a jusante do reservatório de Itaipu. *Revista Unimar*, *15*, 175–189. Retrieved from <ftp://ftp.nupelia.uem.br/users/agostinhoaa/publications/022-UNIMAR-Agostinho-et al.pdf>
- 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), 1119–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19197482>
- 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.
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, *25*(22), 4692–4693.
- ANEEL. (2013). BIG - Banco de Informações de Geração. Retrieved April 14, 2011, from <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.asp>
- Antonio, R. R., Agostinho, A. A., Pelicice, F. M., Bailly, D., Okada, E. K., & Dias, J. H. P. (2007). Blockage of migration routes by dam construction: can migratory fish find alternative routes? *Neotropical Ichthyology*, *5*(2), 177–184.
- Aranishi, F. (2006). Single Fish Egg DNA Extraction for PCR Amplification. *Conservation Genetics*, *7*(1), 153–156.
- Armbruster, J. W. (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoologica Journal of the Linnean Society*, *141*(1), 1–80.
- Baumgartner, G., Nakatani, K., Gomes, L. C., Bialezki, A., Sanches, P. V., & Makrakis, M. C. (2008). Fish larvae from the upper Paraná River: Do abiotic factors affect larval density? *Neotropical Ichthyology*, *6*(4), 551–558.
- Baumgartner, G., Nakatani, K. K., Gomes, L. C., Bialezki, A., Sanches, P. V., & Makrakis, M. C. (2004). Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, *71*(1), 115–125.

- Bialecki, A., Nakatani, K., Sanches, P. V., Baumgartner, G., & Gomes, L. C. (2005). Larval fish assemblage in the Baía River (Mato Grosso do Sul State , Brazil): temporal and spatial patterns. *Environmental Biology of Fishes*, *73*, 37–47.
- Britto, S. G. C., & Carvalho, E. D. (2013). Reproductive migration of fish and movement in a series of reservoirs in the Upper Parana River basin, Brazil. *Fisheries Management and Ecology*, *20*(5), 426–433.
- Burgi, E., & Hershey, a. D. (1963). Sedimentation Rate as a Measure of Molecular Weight of DNA. *Biophysical Journal*, *3*(4), 309–321.
- Carvalho, D., Denise, A. A. O., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C., & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*, *22*(October), 80–86.
- Castro, R. J. de, Nakatani, K., Bialecki, A., Sanches, P. V., & Baumgartner, G. (2002). Temporal distribution and composition of the ichthyoplankton from Leopoldo’s Inlet on the Upper Parana River floodplain (Brazil). *J. Zool. Lond.*, *256*, 437–443.
- Crampton, W., & Hopkins, C. (2005). Nesting and paternal care in the weakly electric fish *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) with descriptions of larval and adult electric organ discharges of two. *Copeia*, *2005*(1), 48–60.
- Ferreira, D. G., Galindo, B. A., Alves, A. N., & Almeida, F. S. (2013). Development and characterization of 14 microsatellite loci in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis* (Perciformes , Cichlidae). *Journal of Fish Biology*, *83*, 1430–1438.
- Ferreira, I. a, Bertollo, L. a C., & Martins, C. (2007). Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* “species complex”. *Cytogenetic and Genome Research*, *118*(1), 78–83.
- Galves, W., Shibatta, O. A., & Jerep, F. C. (2009). Estudos sobre diversidade de peixes da bacia do alto rio Paraná : uma revisão histórica Studies on fish diversity of the upper Paraná river basin : a historical review. *Semina: Ciências Biológicas E Da Saude*, *30*(2), 141–154.
- Goodwin, N. B., Balshine-Earn, S., & Reynolds, J. D. (1998). Evolutionary transitions in parental care in cichlid fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *265*(1412), 2265–2272.
- Hajibabaei, M., Waard, J. R., Ivanova, N. V., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Kirk, S. L., ... Hebert, P. D. N. (2005). Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *360*(1), 1959–1967.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of The Royal Society. B Biological Sciences*, *270*(1512), 313–21.

- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*, *101*(40), 14812–14817.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & DeWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of The Royal Society. B Biological Sciences*, *270*(7), 96–99.
- Hoffmann, A. C., Orsi, M. L., Shibatta, O. A., Biológicas, P. C., Biológicas, C. D. C., Londrina, U. E. De, ... Cid, G. (2005). Diversidade de peixes do reservatório da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), Rio Paranapanema , bacia do alto rio Paraná , Brasil , e a importância dos grandes tributários na sua manutenção. *Iheringia Ser. Zool*, *95*(3), 319–325.
- Hubert, N., Delrieu-trottin, E., Irisson, J., Meyer, C., & Planes, S. (2010). Molecular Phylogenetics and Evolution Identifying coral reef fish larvae through DNA barcoding : A test case with the families Acanthuridae and Holocentridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *55*(3), 1195–1203.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*(1330), 111–120.
- Kipper, D., Bialecki, A., & Santin, M. (2011). Composição taxonômica da assembleia de larvas de peixes no reservatório de Rosana , Rio Paranapanema , Brasil Introdução. *Biota Neotropica*, *11*(1), 421–426.
- Ko, H., Wang, Y., Chiu, T., Lee, M., Leu, M., Chang, K., ... Shao, K. (2013). Evaluating the Accuracy of Morphological Identification of Larval Fishes by Applying DNA Barcoding. *PloS One*, *8*(1), 3–9.
- Lévêque, C., Oberdorff, T., Paugy, D., Stiassny, M. L. J., & Tedesco, P. a. (2008). Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, *595*(1), 545–567. doi:10.1007/s10750-007-9034-0
- Lopes, C., Benedito-Cecilio, E., & Agostinho, A. A. (2000). The reproductive strategy of *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) in the Paraná River basin: the effect of reservoirs. *Revista Brasileira de Biologia*, *60*(2), 255–266.
- Maack, R. (2002). *Geografia Física do Estado do Paraná* (3rd ed., p. 556). Curitiba: Imprensa Oficial.
- Makrakis, M. C., Miranda, L. E., Makrakis, S., Fontes Júnior, H. M., Morlis, W. G., Dias, J. H. P., & Garcia, J. O. (2012). Diversity in migratory patterns among Neotropical fishes in a highly regulated river basin. *Journal of Fish Biology*, *81*(2), 866–881.
- Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C., & Pavanelli, C. S. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação* (1st ed., p. 378). Maringá: EDUEM.

- Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguela, T. C., Benine, R. C., Ortí, G., ... Corrêa e Castro, R. M. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 275. doi:10.1186/1471-2148-11-275
- Orsi, M. L. (2010). *Estratégias reprodutivas de peixes: Estratégia reprodutiva de peixes da região média baixa do rio Paranapanema, Reservatório de Capivara* (1st ed., p. 113). São Paulo: Edgard Blucher.
- Oyakawa, O. T., & Mattox, G. M. T. (2009). Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi : Characiformes : Erythrinidae) with descriptions of two new species. *Neotropical Ichthyology*, 7(2), 117–140.
- Oyakawa, O. T., & Menezes, N. A. (2011). Checklist dos peixes de água doce do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(1).
- Paiva, A. L. B., & Kalapothakis, E. (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Molecular Ecology Resources*, 8(5), 1078–80.
- Pegg, G. G., Sinclair, B., Briskey, L., & Aspden, W. J. (2006). MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef , Australia. *Scientia Marina*, 70(oct 2), 7–12.
- Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14(1), 20.
- Pereira, L. H. G., Maia, G. M. G., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22(1), 71–79.
- Prado, C. P. A., Gomiero, L. M., & Froehlich, O. (2006). SPAWNING AND PARENTAL CARE IN *Hoplias malabaricus* (TELEOSTEI , CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) IN THE SOUTHERN PANTANAL, BRAZIL. *Brazilian Journal of Biology*, 66(2B), 697–702.
- Ratnasingham, S., & Heber. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.bacodingoflife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7(1), 355–364.
- Reynalte-Tataje, D. A., Agostinho, A. A., & Bialecki, A. (2012). Temporal and spatial distributions of the fish larval assemblages of the Ivinheima River sub-basin (Brazil). *Environmental Biology of Fishes*.
- Reynalte-Tataje, D. A., Agostinho, A. A., Bialecki, A., Hermes-Silva, S., Fernandes, R., & Zaniboni-Filho, E. (2012). Spatial and temporal variation of the ichthyoplankton in a subtropical river in Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 94(2), 403–419.

- Reynalte-tataje, D. A., Nakatani, K., Fernandes, R., Agostinho, A. A., & Bialezki, A. (2011). Temporal distribution of ichthyoplankton in the Ivinhema River (Mato Grosso do Sul State / Brazil): Influence of environmental variables. *Neotropical Ichthyology*, 9(2), 427–436.
- Reynalte-Tataje, D., Nuñez, A., Nunes, M., Garcia, V., Lopes, C., & Zaniboni-Filho, E. (2012). Spawning of migratory fish species between two reservoirs of the upper Uruguay River, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 10(4), 829–835.
- Rizzo, E., Sato, Y., Barreto, B. P., & Godinho, H. P. (2002). Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 61(3), 615–632. doi:10.1006/jfbi.2002.2085
- Sanches, P. V., Nakatani, K., Bialezki, A., Baumgartner, G., Gomes, L. C., & Luiz, E. A. (2006). Flow regulation by dams affecting ichthyoplankton: the case of the Porto Primavera Dam, Paraná River, Brazil. *River Research and Applications*, 22(5), 555–565. doi:10.1002/rra.922
- Shibatta, O. A., Gealh, A. M., & Bennemann, S. T. (2008). Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, 7(2), 125–134.
- Suzuki, H., 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(3), 791–807.
- Suzuki, H. I. (1999). *Estratégias reprodutivas de peixes relacionadas ao sucesso na colonização em dois reservatórios do Rio Iguaçu, Pr, Brasil*. Universidade Federal de São Carlos.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood , Evolutionary Distance , and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739.
- Togawa, R. C., & Brigido, M. M. (2003). PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In *1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi* (p. 1). Ribeirão Preto.
- Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elias-Gutiérrez, M., Balderas, S. C., & Hebert, P. D. N. (2009). Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology*, 74(1), 377–402.
- 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(2), 139–151.
- Vicari, M., Pazza, R., & Artoni, R. (2006). Cytogenetics and biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçu River. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(2), 297–303.

- Vono, V., Silva, L. G. M., Maia, B. P., & Godinho, H. P. (2002). Biologia reprodutiva de três espécies simpátricas de peixes neotropicais: *Pimelodus maculatus* Lacépede (Siluriformes, Pimelodidae), *Leporinus amlyrhynchus* Garavello & Britski e *Schizodon nasutus* Kner (Characiformes, Anostomidae) do recém-formado Reservató. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19(3), 819–826.
- Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. N. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74(2), 329–56.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P. D. N., & B, P. T. R. S. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360, 1847–1857.
- Wiegand, M. (1996). Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 286, 259–286.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados confirmam as altas taxas de sucesso da metodologia DNA *barcoding* para a identificação molecular de ictioplâncton, demonstrando como estes dados são especialmente úteis na identificação de táxons que comumente apresentam problemas de identificação, tais quais as espécies das famílias Anostomidae, Loricariidae e Characidae. A inclusão de amostras de ovos na análise da constituição das assembleias ictioplanctônicas, possibilitada pela identificação molecular, demonstra um importante aumento na riqueza de espécies, bem como podem evidenciar a ocorrência de táxons exclusivos a esse tipo de amostra.

Considerando os dados aqui apresentados e os resultados de trabalhos anteriores realizados na bacia do médio rio Paranapanema, além da recente finalização da UHE de Mauá na porção média do rio Tibagi, sugere-se que a bacia do rio das Cinzas seja mantida livre de barramentos para manter uma rota migratória alternativa para espécies de peixes do reservatório de Capivara, visando possibilitar a autossustentação das populações de peixes e um subsequente estoque de diversidade para ictiofauna regional.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Protocolo de preparo das soluções de trabalho

1. **Protocolo para tampão de extração:** Pesar 1 g de Chelex100 (BIO-RAD)* em um recipiente para armazenagem da solução e adicionar 1 mL de água ultra pura (MilliQ).
2. **Protocolo de preparo para Proteinase K:** Pesar 20 mg de Proteinase K(Invitrogen) em microtubo 1,5 mL completar com 1mL de tampão (Tris-HCl 50mM pH8,0+ acetato de cálcio 5mM).
3. **Protocolo de execução:** Distribuir 200 μ L ou 100 μ L do tampão de extração, respectivamente para larvas ou ovos, em cada poço da placa ou microtubo; Distribuir as amostras em na placa ou microtubos; acrescentar 2 μ L de Proteinase K para cada amostra; Agitar a placa ou microtubo em vortex por 10 segundo; Levar ao termociclador ou banho maria; manter 55 minutos à 65°C; manter 5 minutos à 95°C; Opcionalmente centrifugar e retirar sobrenadante.

*Nota de execução: Como Chelex100 é uma resina insolúvel em água é necessário homogeneizar constantemente a substância durante a manipulação.

APÊNDICE 3: Checklist, média dos resultados de similaridade e relação de distância para o táxon mais próximos

Ordem/Família/Espécie	N	BOLD-IDS ± E.P	D ± E.P	NN	NND ± E.P
CHARACIFORMES					
Anostomidae					
<i>Leporinus amblyrhynchus</i> Garavello & Britski, 1987	4	99,69±0,22	0,15±0,1	<i>Leporinus obtusidens</i>	5,54±0,84
<i>Leporinus piavussu</i> Britski, Birindelli & Garavello, 2012	4	99,80±0,20	1,25±0,3	<i>Leporinus octofasciatus</i>	6,19±1
<i>Leporinus friderici</i> (Bloch, 1794)	64	99,68±0,26	0,33±0,08	<i>Leporinus obtusidens</i>	11,75±1,38
<i>Leporinus macrocephalus</i> Garavello & Britski, 1988	4	99,64±0,41	0,38±0,16	<i>Leporinus piavussu</i>	5,54±0,84
<i>Leporinus obtusidens</i> (Valenciennes, 1837)	7	99,92±0,08	0,44±0,18	<i>Leporinus octofasciatus</i>	6,19±1
<i>Leporinus octofasciatus</i> Steindachner, 1915	10	99,88±0,08	0±0	<i>Astyanax bockmanni</i>	22,7±2,09
<i>Schizodon nasutus</i> Kner, 1858	2	99,76±0,18	0±0	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	11,01±1,29
Characidae					
<i>Astyanax bockmanni</i> Vari & Castro, 2007	8	99,56±0,38	0,25±0,12	<i>Piabina argentea</i>	20,34±1,93
<i>Bryconamericus iheringii</i> (Boulenger, 1887)	1	99,69±0,00	x	<i>Piabina argentea</i>	9,31±1,24
<i>Bryconamericus stramineus</i> Eigenmann, 1908	4	99,66±0,39	0,07±0,07	<i>Bryconamericus iheringii</i>	10,24±1,32
<i>Galeocharax knerii</i> (Steindachner, 1879)	8	99,50±0,26	0,12±0,08	<i>Bryconamericus iheringii</i>	18,65±1,85
<i>Moenkhausia intermedia</i> (Eigenmann, 1908)	7	99,67±0,43	0,44±0,17	<i>Astyanax bockmanni</i>	22,7±2,09
<i>Piabina argentea</i> Reinhardt, 1867	21	99,59±0,39	1,14±0,3	<i>Bryconamericus iheringii</i>	9,31±1,24
<i>Triportheus nematurus</i> (Kner, 1858)	32	99,95±0,09	0,32±0,12	<i>Hypostomus strigaticeps</i>	22,16±2,09
Curimatidae					
<i>Cyphocharax modestus</i> (Fernández-Yépez, 1948)	1	99,85	x	<i>Cichlasoma paranaense</i>	17,87±2,97
Erythrinidae					
<i>Hoplias intermedius</i> (Günther, 1864)	1	99,22	x	<i>Hoplias sp</i>	6,3±0,96
<i>Hoplias sp.</i>	1	96,90	x	<i>Hoplias intermedius</i>	6,3±0,96
Parodontidae					
<i>Apareiodon ibitiensis</i> Amaral Campos, 1944	8	99,47±0,54	1,14±0,25	<i>Apareiodon piracicabae</i>	10,26±1,32
<i>Apareiodon piracicabae</i> (Eigenmann, 1907)	10	99,84±0,34	0,62±0,2	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	10,26±1,32
Prochilodontidae					
<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)	18	99,67±0,31	0,83±0,18	<i>Leporinus octofasciatus</i>	16,45±1,66
Serrasalminidae					
<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)	16	99,8±0,11	0,7±0,2	<i>Leporinus octofasciatus</i>	18,11±1,85

Continuação do Apêndice 3

GYMNOTIFORMES

Sternopygidae

Eigenmannia trilineata López & Castello, 1966 1 99,04 x *Cichlasoma paranaense* 14,76±2,67

PERCIFORMES

Cichlidae

Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) 1 98,75 x *Cichlasoma paranaense* 16,43±2,94

Cichlasoma paranaense Kullander, 1983 1 99,58 x *Eigenmannia trilineata* 14,76±2,67

Geophagus brasiliensis (Quoy & Gaimard, 1824) 7 99,80±0,18 0,23±0,11 *Cichlasoma paranaense* 16,98±2,91

Scianidae

Plagioscion squamosissimus (Heckel, 1840) 18 99,97±0,12 0,06±0,06 *Cichlasoma paranaense* 21,22±3,44

SILURIFORMES

Auchenipteridae

Tatia neivai (Ihering, 1930) 2 99,61±0,39 0,77±0,33 *Cetopsys gobioides* 19,81±1,86

Cetopsidae

Cetopsis gobioides Kner, 1858 1 99,21 x *Bryconamericus iheringii* 19,23±1,91

Challychthyidae

Hoplosternum littorale (Hancock, 1828) 1 100 x *Cichlasoma paranaense* 19,54±3,23

Heptapteridae

Cetopsorhamdia iheringi Schubart and Gomes, 1959 2 99,22±0,04 0±0 *Hoplias intermedius* 19,23±1,91

Loricariidae

Hypostomus ancistroides (Ihering, 1911) 1 99,50 x *Hypostomus regani* 10,04±1,3

Hypostomus regani (Ihering, 1905) 3 99,73±0,47 0,51±0,22 *Hypostomus strigaticeps* 3,91±0,75

Hypostomus strigaticeps (Regan, 1908) 1 99,73±0,47 x *Hypostomus regani* 3,91±0,75

Pimelodidae

Pimelodus maculatus Lacepède, 1803 245 99,79±0,21 0,63±0,16 *Sorubim lima* 15±1,6

Pseudoplatystoma corruscans (Spix & Agassiz, 1829) 5 99,07±0,0 0±0 *Sorubim lima* 11,01±1,29

Sorubim lima (Spix & Agassiz, 1829) 14 99,50±0,08 0,18±0,11 *Pseudoplatystoma corruscans* 11,01±1,29

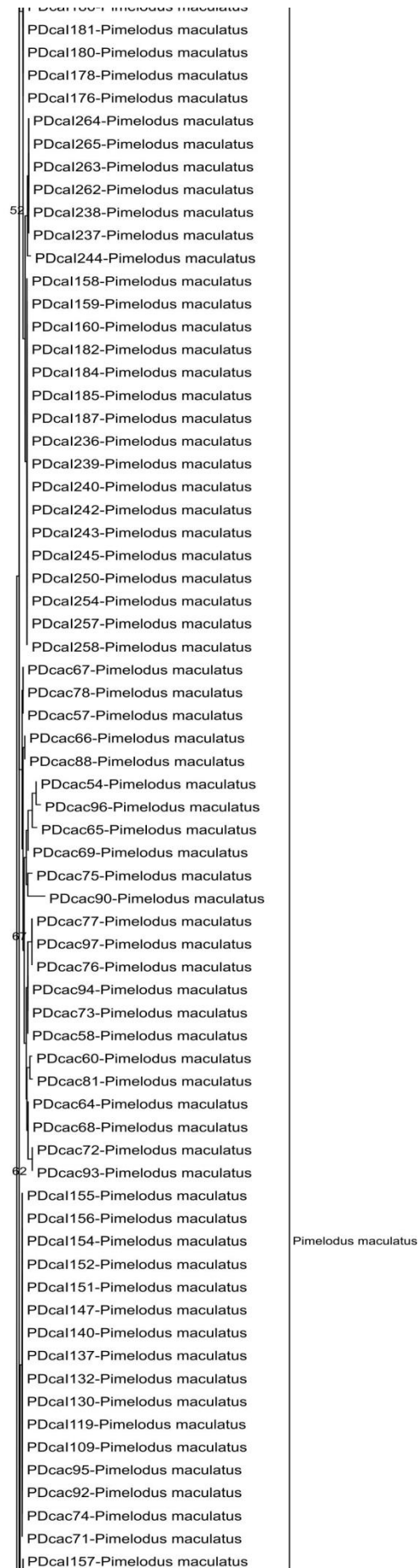
Steindachneriodion scriptum (Miranda Ribeiro, 1918) 2 100±0,00 0±0 *Sorubim lima* 14,82±1,69

N- Número de capturas; **BOLD-IDS**: Valor de similaridade entre a sequência do adulto no BOLD e da amostra submetida, E.P – erro padrão; **D**: Distância intraespecífica E.P erro padrão; **NN**: Táxon mais próximo dentre os avaliados no presente trabalho; **NND**: Distância para o táxon mais próximo no conjunto de dados do presentes estudo, E.P. erro padrão.

APÊNDICE 4 – Árvore Neighbor Joining - K2P completa das 536 amostras de ovos e larvas do médio rio Paranapanema, representando a distribuição gráfica das distâncias genéticas.

PDcal150-Pimelodus maculatus
 PDcal153-Pimelodus maculatus
 PDcal149-Pimelodus maculatus
 PDcal148-Pimelodus maculatus
 PDcal142-Pimelodus maculatus
 PDcal141-Pimelodus maculatus
 PDcal139-Pimelodus maculatus
 PDcal138-Pimelodus maculatus
 PDcal136-Pimelodus maculatus
 PDcal135-Pimelodus maculatus
 PDcal134-Pimelodus maculatus
 PDcal133-Pimelodus maculatus
 PDcal131-Pimelodus maculatus
 PDcal129-Pimelodus maculatus
 PDcal128-Pimelodus maculatus
 PDcal127-Pimelodus maculatus
 PDcal126-Pimelodus maculatus
 PDcal125-Pimelodus maculatus
 PDcal124-Pimelodus maculatus
 PDcal122-Pimelodus maculatus
 PDcal116-Pimelodus maculatus
 PDcal112-Pimelodus maculatus
 PDcal104-Pimelodus maculatus
 PDcal103-Pimelodus maculatus
 PDcac91-Pimelodus maculatus
 PDcac70-Pimelodus maculatus
 PDcac53-Pimelodus maculatus
 PDcac52-Pimelodus maculatus
 PDcac50-Pimelodus maculatus
 PDcac49-Pimelodus maculatus
 PDcac48-Pimelodus maculatus
 PDcac47-Pimelodus maculatus
 PDcac46-Pimelodus maculatus
 PDcac45-Pimelodus maculatus
 PDcac43-Pimelodus maculatus
 PDcac42-Pimelodus maculatus
 PDcac41-Pimelodus maculatus
 PDcac40-Pimelodus maculatus
 PDcac39-Pimelodus maculatus
 PDcac38-Pimelodus maculatus
 PDcac37-Pimelodus maculatus
 PDcac36-Pimelodus maculatus
 PDcac35-Pimelodus maculatus
 PDcac34-Pimelodus maculatus
 PDcac33-Pimelodus maculatus
 PDcac32-Pimelodus maculatus
 PDcac31-Pimelodus maculatus
 PDcac30-Pimelodus maculatus
 PDcac29-Pimelodus maculatus
 PDcac28-Pimelodus maculatus
 PDcac27-Pimelodus maculatus
 PDcac26-Pimelodus maculatus
 PDcac44-Pimelodus maculatus
 PDcac51-Pimelodus maculatus
 PDcal260-Pimelodus maculatus
 PDcal261-Pimelodus maculatus
 PDcal259-Pimelodus maculatus
 PDcal256-Pimelodus maculatus
 PDcal252-Pimelodus maculatus
 PDcal251-Pimelodus maculatus
 PDcal249-Pimelodus maculatus
 PDcal248-Pimelodus maculatus
 PDcal247-Pimelodus maculatus
 PDcal246-Pimelodus maculatus
 PDcal241-Pimelodus maculatus
 PDcal193-Pimelodus maculatus
 PDcal189-Pimelodus maculatus
 PDcal188-Pimelodus maculatus
 PDcal186-Pimelodus maculatus

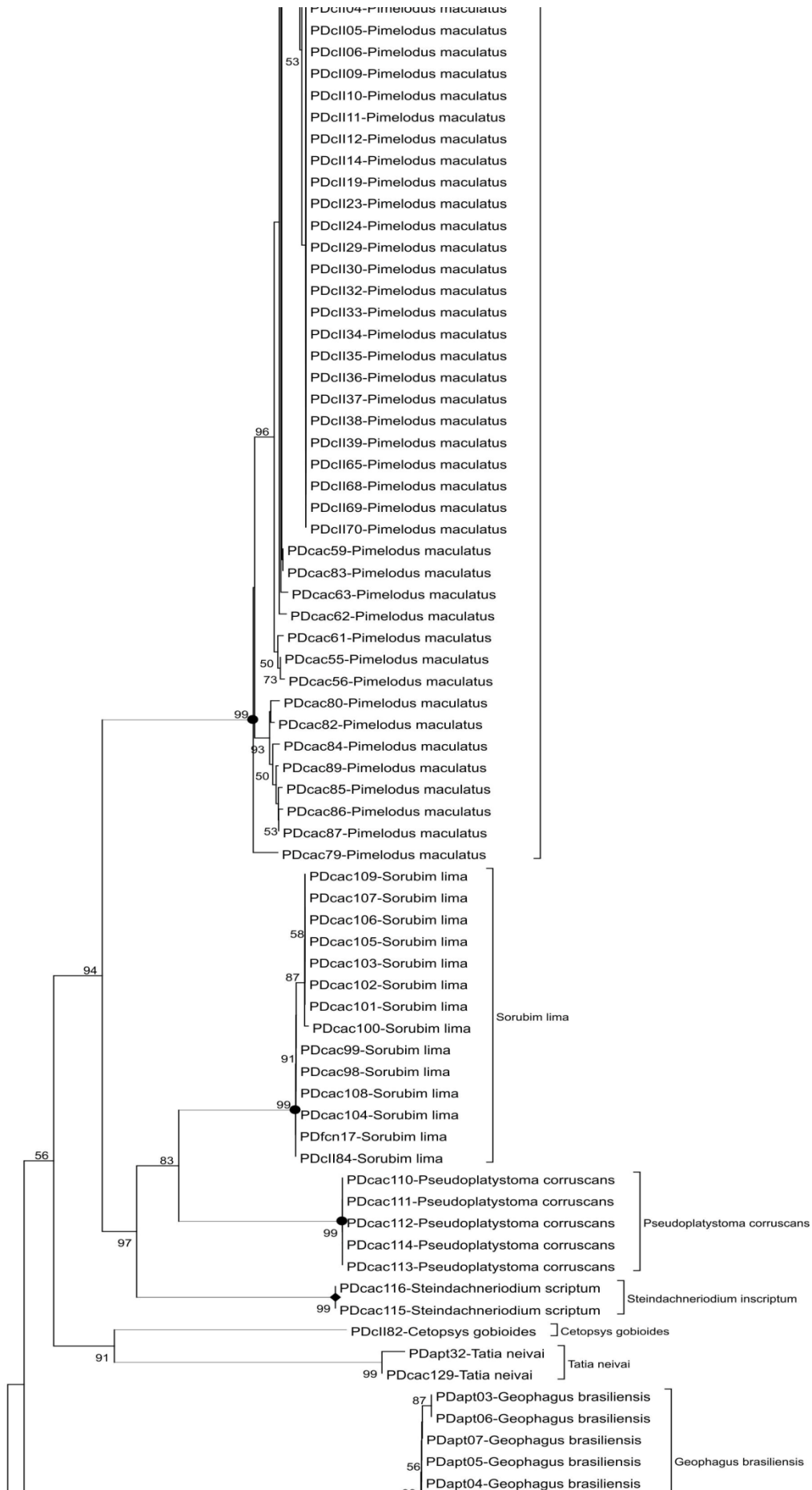
A relação de distância genéticas K2P entre as seqüências das diferentes amostras foi inferida utilizando o método de Neighbor-Joining com base no modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros com taxa de substituição modelada com distribuição gamma (shape parameter = 1) e deleção completa. A árvore ótima para a soma dos comprimentos dos braços (comprimento = 1.26817268) é exibida. Os valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram ocultados. A análise envolveu 28 seqüências nucleotídicas com base no primeiro, segundo e terceiro códons completando 648 posições ao final do conjunto de dados.



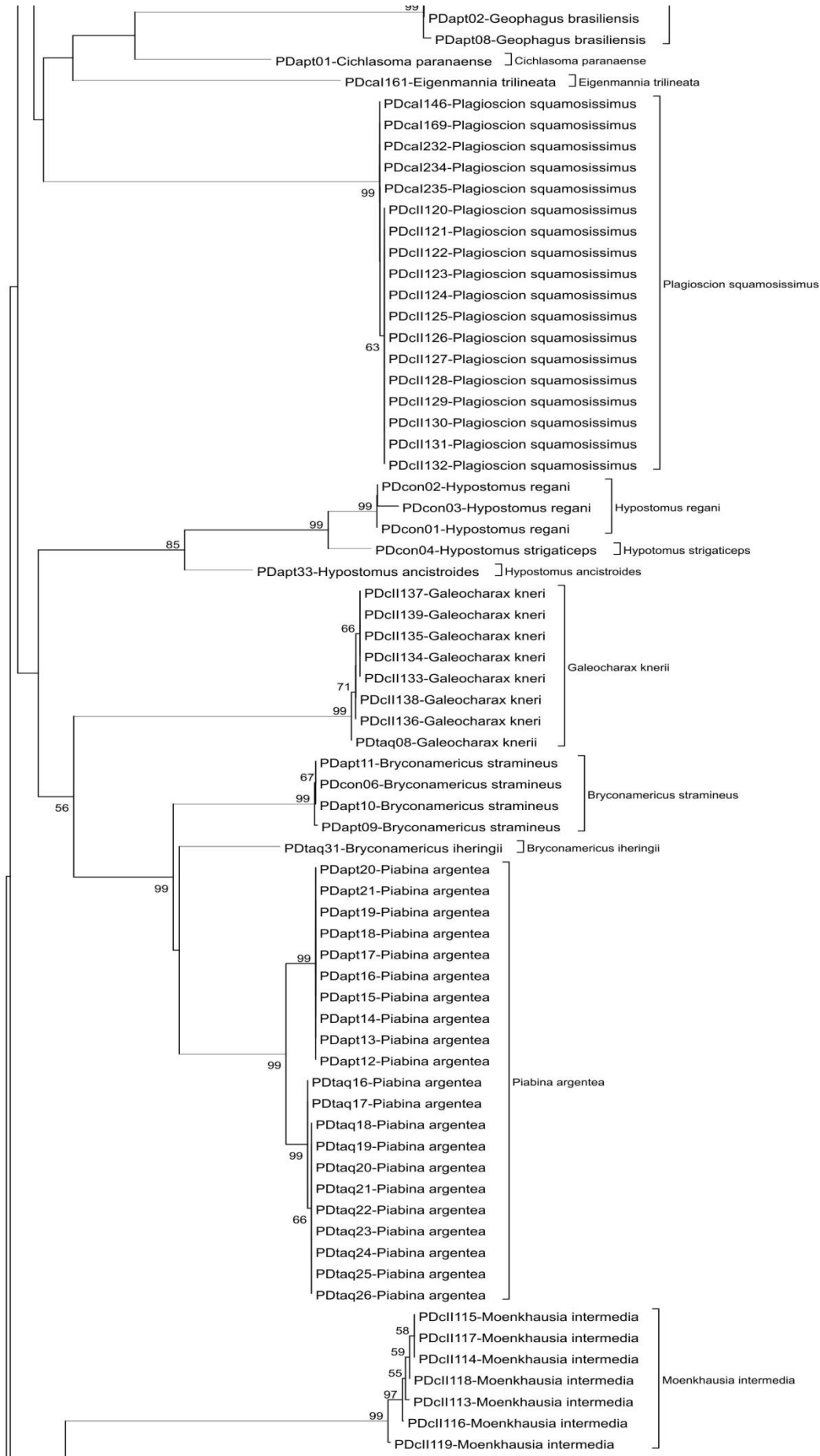
Continuação Anexo 4
Arvore NJ-K2P completa (536 táxons)

PDcal162-Pimelodus maculatus
 PDcal123-Pimelodus maculatus
 PDcal121-Pimelodus maculatus
 PDcal120-Pimelodus maculatus
 PDcal115-Pimelodus maculatus
 PDcal114-Pimelodus maculatus
 PDcal113-Pimelodus maculatus
 PDcal105-Pimelodus maculatus
 PDcal117-Pimelodus maculatus
 PDcal118-Pimelodus maculatus
 PDcal111-Pimelodus maculatus
 PDcal110-Pimelodus maculatus
 PDcll02-Pimelodus maculatus
 PDcll07-Pimelodus maculatus
 PDcll15-Pimelodus maculatus
 PDcll17-Pimelodus maculatus
 PDcll20-Pimelodus maculatus
 PDcll22-Pimelodus maculatus
 PDcll25-Pimelodus maculatus
 PDcll26-Pimelodus maculatus
 PDcll27-Pimelodus maculatus
 PDcll28-Pimelodus maculatus
 PDcll31-Pimelodus maculatus
 PDcll40-Pimelodus maculatus
 PDcll41-Pimelodus maculatus
 PDcll42-Pimelodus maculatus
 PDcll43-Pimelodus maculatus
 PDcll44-Pimelodus maculatus
 PDcll45-Pimelodus maculatus
 PDcll46-Pimelodus maculatus
 PDcll47-Pimelodus maculatus
 PDcll48-Pimelodus maculatus
 PDcll50-Pimelodus maculatus
 PDcll51-Pimelodus maculatus
 PDcll52-Pimelodus maculatus
 PDcll53-Pimelodus maculatus
 PDcll54-Pimelodus maculatus
 PDcll56-Pimelodus maculatus
 PDcll58-Pimelodus maculatus
 PDcll59-Pimelodus maculatus
 PDcll60-Pimelodus maculatus
 PDcll61-Pimelodus maculatus
 PDcll62-Pimelodus maculatus
 PDcll63-Pimelodus maculatus
 PDcll64-Pimelodus maculatus
 PDcll71-Pimelodus maculatus
 PDcll72-Pimelodus maculatus
 PDcll74-Pimelodus maculatus
 PDcll75-Pimelodus maculatus
 PDcll76-Pimelodus maculatus
 PDcll77-Pimelodus maculatus
 PDcll78-Pimelodus maculatus
 PDcll79-Pimelodus maculatus
 PDcll80-Pimelodus maculatus
 PDcll81-Pimelodus maculatus
 PDcll67-Pimelodus maculatus
 PDcll73-Pimelodus maculatus
 PDcll66-Pimelodus maculatus
 PDcll55-Pimelodus maculatus
 PDcll16-Pimelodus maculatus
 PDcll08-Pimelodus maculatus
 PDcll49-Pimelodus maculatus
 PDcll57-Pimelodus maculatus
 PDcll21-Pimelodus maculatus
 PDcll18-Pimelodus maculatus
 PDcll13-Pimelodus maculatus
 PDcll01-Pimelodus maculatus
 PDcll03-Pimelodus maculatus
 PDcll04-Pimelodus maculatus

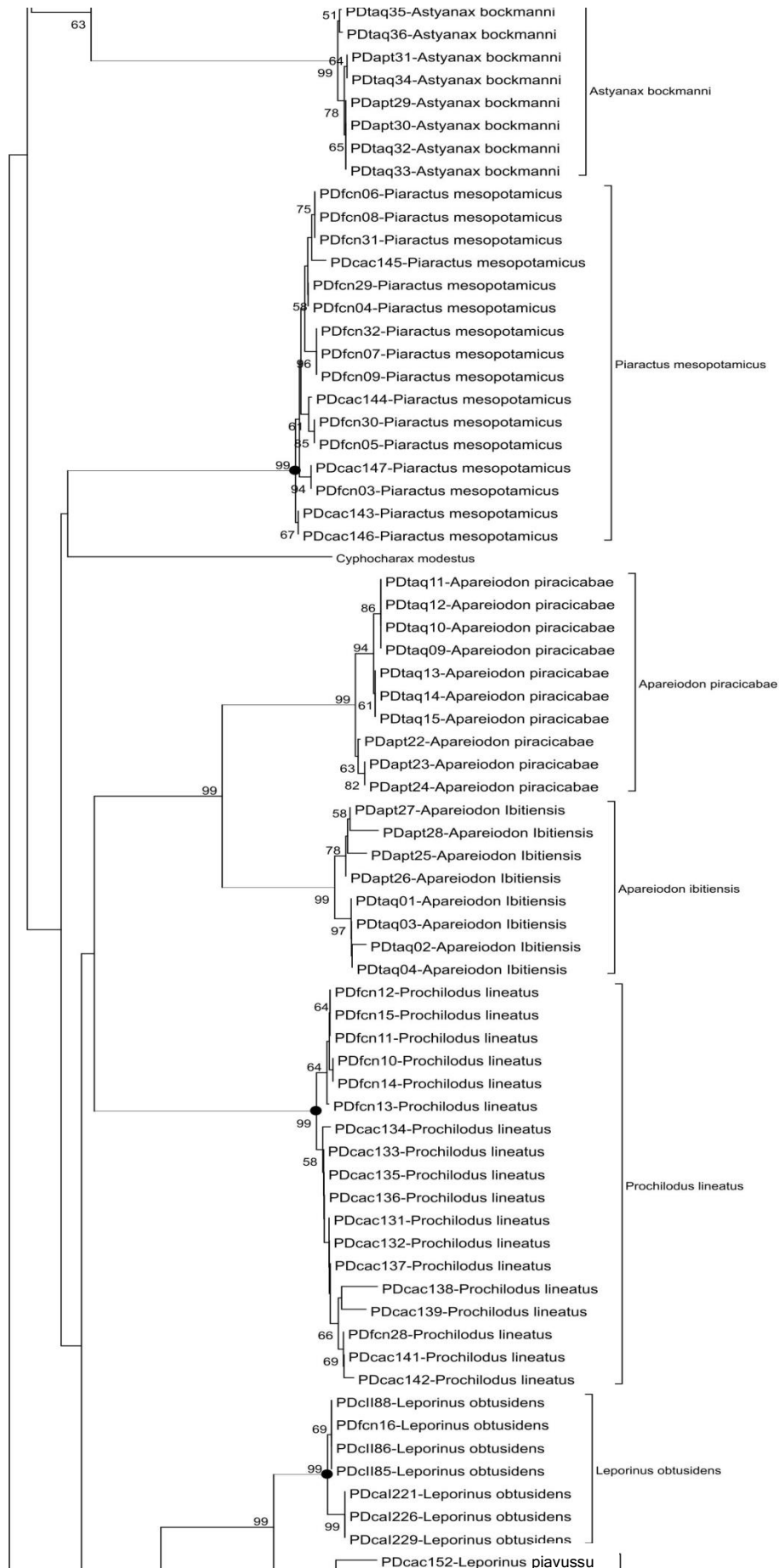
Continuação Anexo 4
 Arvore NJ-K2P completa (536 táxons)



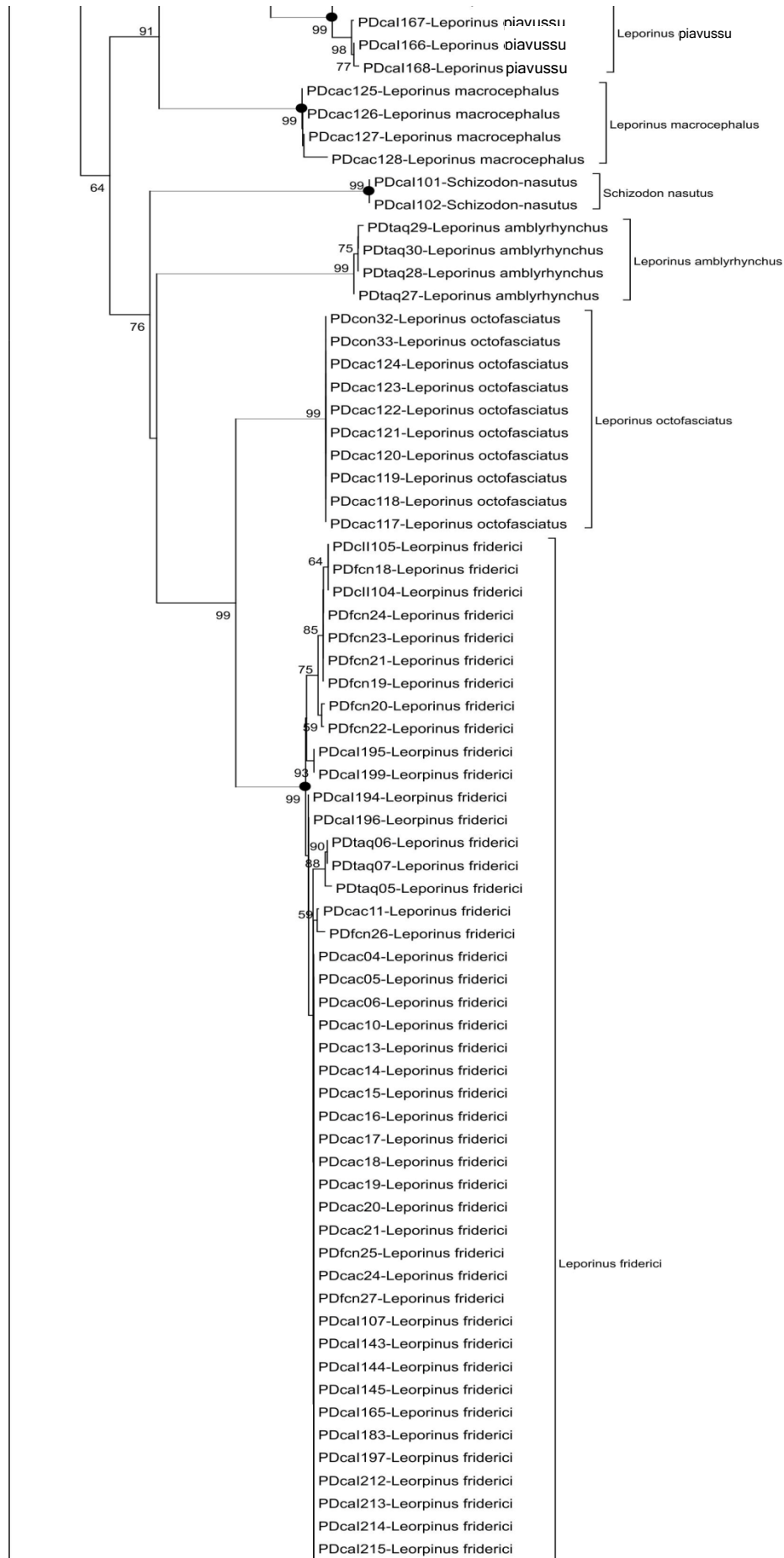
Continuação Anexo 4
Arvore NJ-K2P completa (536 táxons)



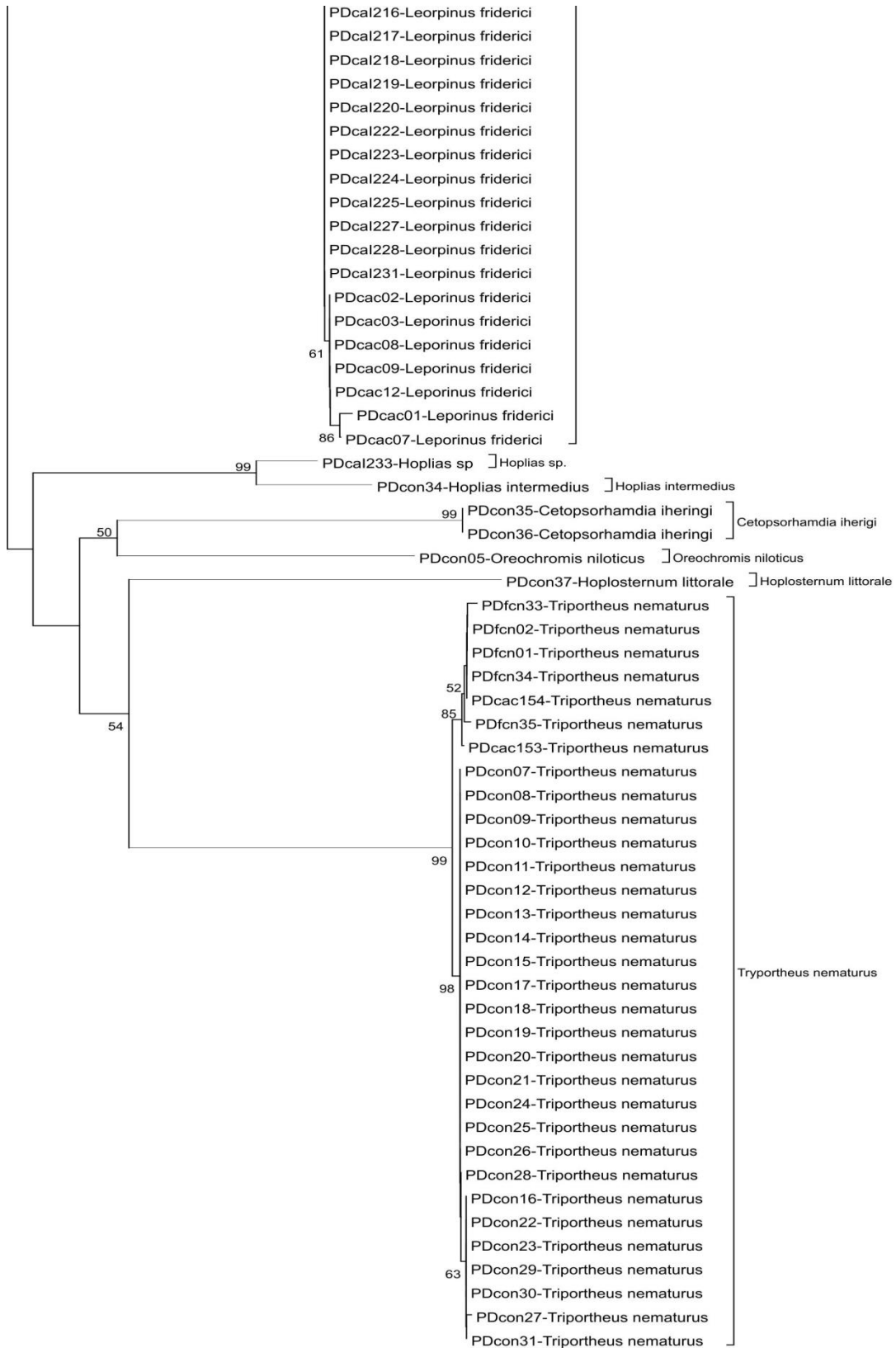
Continuação Anexo 4
Arvore NJ-K2P completa (536 táxons)



Continuação Anexo 4
Arvore NJ-K2P completa (536 táxons)



Continuação Anexo 4
Arvore NJ-K2P completa (536 táxons)



Continuação do anexo 5, sítios variáveis

Táxon	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	1	1	1	1	1	1	1	2	2
	1	2	5	6	7	8	9	0	1
PDapt22-Apareiodon piracicabae	A	C	G	G	C	A	G	G	C
PDapt25-Apareiodon ibitiensis	.	.	C	C	G
PDapt29-Astyanax bockmanni	.	.	T	G
PDapt09-Bryconamericus stramineus	.	.	A	A
PDtaq31-Bryconamericus iheringi
PDcon36-Cetopsorhamdia iheringi	G	A	C	A	G	C	C	.	G
PDcII82-Cetopsys gobioides	C	.	.	G
PDcac130-Cyphocharax modestus	.	.	T	.	.	C	.	.	.
PDcaI161-Eigenmannia trilineata	A
PDcIII33-Galeocharax kneri	.	.	C	G
PDapt02-Geophagus brasiliensis	.	.	T	A
PDcaI233-Hoplias sp	.	.	T	.	.	G	.	.	G
PDcon34-Hoplias intermedius	G	A	C	T	G	C	.	.	G
PDcon37-Hoplosternum littorale	G	A	C	.	G	C	A	.	G
PDapt33-Hypostomus ancistroides	.	.	T	A
PDcon02-Hypostomus regani	G	A	C	T	G	C	A	.	G
PDcon04-Hypostomus strigaticeps	G	A	C	T	G	C	A	.	G
PDcac01-Leporinus friderici	A
PDcac117-Leporinus octofasciatus	.	.	A	A
PDcac125-Leporinus macrocephalus	.	.	C	.	.	T	.	.	A
PDcac152-Leporinus piavussu
PDcaI221-Leporinus obtusidens	.	.	T
PDtaq27-Leporinus amblyrhynchus	.	.	T	A
PDcIII113-Moenkhausia intermedia	A
PDcon05-Oreochromis niloticus	G	A	C	T	G	C	C	.	G
PDapt12-Piabina argentea	G
PDcac143-Piaractus mesopotamicus	.	.	C	.	.	G	.	.	G
PDcII81-Pimelodus maculatus	A
PDcaI146-Plagioscion squamosissimus	.	.	A	A
PDcac131-Prochilodus lineatus	.	.	T	.	.	T	.	.	A
PDcac110-Pseudoplatystoma corruscans	.	.	A	A
PDcaI101-Schizodon-nasutus	.	.	T	A
PDcac100-Sorubim lima	.	.	A
PDcac115-Steindachneriodium scriptum	.	.	A	A
PDapt32-Tatia neivai
PDfcn35-Triportheus nematurus	G	A	T	T	G	C	A	.	G

REFERÊNCIAS GERAIS

- AGOSTINHO, A. A.; MIRANDA, L. E.; BINI, L. M.; GOMES, L. C.; THOMAZ, S. M.; SUZUKI, H. I. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: TUNDISI, J. G.; STRASKRABA, M. (eds.). **Theoretical reservoir ecology and its applications**. Leiden: Backhuys Publishers, 1999. p. 227-265.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; VERI, S.; OKADA, E. K. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. **Fish Biology and Fisheries**, v. 14, n. 1, p. 11-19, 2004a.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: EDUEM. 2007b.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO J. R.; H. F.; BORGHETTI, J. R. Considerações Sobre os Impactos dos Represamentos na Ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de Caso: Reservatório de Itaipu. **Revista Unimar**, v. 14, n. 1, p. 90-107, 1992.
- AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian journal of biology**, v. 68, n. 1, n. 4, p. 1119–32, 2008.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. **Conservation Biology**, v. 19, n. 1, p. 646-652, 2005.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Threats for biodiversity in the floodplain of the Upper Paraná River: effects of hydrological regulation by dams. **Ecohydrology and Hydrobiology**, v. 4, n. 1, p. 255-256, 2004b.
- ALMEIDA, F. S.; FUNGARO, M. H. P.; SODRÉ, L. M. K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. **Journal of Zoology**, v. 253, n. 1, p. 113-120, 2001.
- ARIF, I. A.; KHAN, H. A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 32, n. 1, p. 9–17, 2009.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2004.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.
- AVISE, J. C. Systematic value of electrophoretic data. **Systematic Zoology**, v. 23, n. 1, p. 465-480, 1975.
- BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 1, p. 729-744, 2004.
- BAUMGARTNER, G.; NAKATANI, K.; GOMES, L. C. BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C. Fish larvae from the upper Paraná River: Do abiotic factors affect larval density? **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 1, p. 551-558, 2008.

- BAUMGARTNER, G.; NAKATANI, K.; GOMES, L. C.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C. Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River , Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 72, n. 1, p. 115-125, 2004.
- BIALETZKI, A.; NAKATANI, K.; SANCHES, P. V.; BAUMGARTNER, G.; GOMES, L. C. Larval fish assemblage in the Baía River (Mato Grosso do Sul State , Brazil): temporal and spatial patterns. **Environmental Biology of Fishes**, v. 73, n. 1, p. 37-47, 2005.
- BICKHAM J. W.; SAHNDHU S.; HEBERT P. D. N.; CHIKHI, L. e RAGHBIR A, Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v. 463, n. 1, p. 33-51, 2000.
- BIRKY, C. W. Review Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. **Proceeding National Academic Sciences**, v. 92, n. 1, p. 11331-11338, 1995.
- BISBY, F.A.; ROSKOV, Y.R.; ORRELL, T.M; NICOLSON, D.; PAGLINAWAN, L.E.; BAILLY, N.; KIRK, P.M; BOURGOIN, T.; BAILLARGEON, G. (eds) (2009). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2009 Annual Checklist. Disponível em: <<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2014/>>. Acesso em: 18 mar. 2014.
- BLAXTER, M. L. The promise of a DNA taxonomy. **Philosophical Transitions B**, v. 359, n. 1, p. 669-679, 2004.
- BOORE, J. L. Animal Mitochondrial Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 1767-1780, 1999.
- BRANDÃO, H.; VIDOTTO-MAGNONI, A.; RAMOS, I.; CARVALHO, E. D. Assessment of the ichthyofauna in stretches under the influence of Salto Grande Reservoir (Middle Paranapanema River , SP/PR , Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 21, n. 1, p. 451-463, 2009.
- BRITO, S. G. C.; CARVALHO, E. D. Ecological attributes of fish fauna in the Taquaruçu Reservoir , Paranapanema River (Upper Paraná , Brazil): composition and spatial Study area. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 18, n. 1, p. 377-388, 2006.
- BROOKES, A J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177–86, 1999.
- BRUFORT, M. W.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J.F.Y; BURKE, T. Single locus and multilocus DNA fingerprint. In: HOEZEL, A. R. ed. **Molecular genetic analysis populations: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1992. p. 225-269.
- BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M.S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro, Museu Nacional. 2ªed, 2007.
- BUNN, S. E.; ARTHINGTON, A. H. Basic Principles and Ecological Consequences of Altered Flow Regimes for Aquatic Biodiversity. **Environmental Management**, v. 30, n. 1, p. 492-507, 2002.

CARVALHO, E. D.; SILVA, V. F. B.; FUJIHARA, C. Y.; HENRY, R.; FORESTI, F. Diversity of fish species in the river Paranapanema – Jurumirim Reservoir transition region (São Paulo, Brazil). **Italian Journal Zoology**, v. 65, n. 1, p. 325-330, 1998.

CASTRO, R. J. DE; NAKATANI, K.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; BAUMGARTNER, G. Temporal distribution and composition of the ichthyoplankton from Leopoldo's Inlet on the Upper Paraná River floodplain (Brazil). **Journal of Zoology**, v. 256, n. 1, p. 437-443, 2002.

COOPER, J. K.; SYKES, G.; KING, S.; COTTRILL, K.; IVANOVA, N. V.; HANNER, R.; IKONOMI, P. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. **Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 43, n. 1, p. 344–351, 2005.

CUI, Z.; LIU, Y.; LI, C. P.; YOU, F.; CHU, K. H. The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. **Gene**, v. 432, n. 2, p. 33-43, 2009.

DANNA, K.; NATHANS, D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. 1971. **Reviews in medical virology**, v. 9, n. 2, p. 75–81, 1971.

DAVIES, N.; VILLABLANCA, F.; RODERICK, G. Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 1, p. 17–21, 1999.

DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A. H.; GESSNER, M. O.; KAWABATA, Z.-I.; KNOWLER, D. J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R. J.; et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 81, n. 1, p. 163-82, 2006.

DUKE ENERGY. **Peixes do rio Paranapanema**. Editora Horizonte Geográfico, São Paulo. 2008.

ESCHMEYER, W. N.; FICKER, R. (ed). **CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES**. (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Acesso em: 18 mar. 2014.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 1, p. 783-791, 1985.

FERNANDES, R.; AGOSTINHO, A. A.; FERREIRA, E. A.; PAVANELLI, C. S.; SUZUKI, H. I.; LIMA, D. P.; GOMES, L. C. Effects of the hydrological regime on the ichthyofauna of riverine environments of the Upper Paraná River floodplain. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 1, p. 669-80, 2009.

FERREIRA M. E.; GRATAPAGLIA D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análises genéticas**. Brasília: EMPRAPA-CENARGEN. 1995.

FERREIRA, I. A.; BERTOLLO, L. A. C.; MARTINS, C. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with

- emphasis on the *Hoplias malabaricus* “species complex”. **Cytogenetic and genome research**, v. 118, n. 1, p. 78-83, 2007.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 294-299, 1994.
- FRANKHAM, R.; BALOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. SBG (Sociedade Brasileira de Genética) Ribeirão Preto, SP., 2008.
- FUTUYMA, D. J.; MORENO, G. The evolution of ecological specialization. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 19, n. 1, p. 207-233, 1988.
- GALETTI JR, P. M.; et al. Genética da conservação brasileira. p. 244-274. In: **Fundamentos de Genética da Conservação**. FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D.A., Ribeirão Preto, SP, Editora SBG, 2008.
- GALVES, W.; SHIBATTA, O. A.; JEREP, F. C. Estudos sobre diversidade de peixes da bacia do alto rio Paraná : uma revisão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 30, n. 1, p. 141-154, 2009.
- HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v. 79, n. 1, p. 413–425. 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, n. 1, p. 95-98, 1999.
- HANNER, R.; CORTHALS, A.; DESSAUER, H. C. Salvage of genetically valuable tissues following a freezer failure. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, n. 1, p. 452-455, 2005.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. J. **Princípios de Genética de Populações**. 3ed. ArtMed, Porto Alegre, 2008.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Real Society B**, v. 270, n. 1, p. 313-321, 2003a.
- HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 1, p. 14812-14817, 2004a.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. **Proceedings of the Real Society B**, v. 270, n. 1, p. 96-99, 2003b.
- HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, n. 1, p. 312, 2004b.
- HILSDORF, A.; PETRERE JR, M. Conservação de peixes na bacia do rio do Paraíba do Sul. **Revista Ciência Hoje**, v. 30, n. 1, p. 62-65, 2002.

- HOFFMANN, A. C.; ORSI, M. L.; SHIBATTA, O. A. *et al.* Diversidade de peixes do reservatório da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), Rio Paranapanema , bacia do alto rio Paraná , Brasil , e a importância dos grandes tributários na sua manutenção. v. 95, n. 1, p. 319-325, 2005.
- JACKSON, R. B.; CARPENTER, S. R.; DAHM, C. N. *et al.* Water in a changing World. **Ecological Applications**, v. 11, n. 1, p. 1027-1045, 2001.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, L. S. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. **Nature**, v. 374, n. 1, p. 67-73, 1985.
- JÚLIO JÚNIOR, H. F.; THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO A. A.; LATINI, J. D. Distribuição e Caracterização dos Reservatórios In: RODRIGUES, L.; THOMAZ S. M.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Biocenose em reservatórios padrões espaciais e temporais**. São Carlos, SP., 2005, p. 5-37.
- KIPPER, D.; BIALETZKI, A.; SANTIN, M. Composição taxonômica da assembleia de larvas de peixes no reservatório de Rosana , Rio Paranapanema , Brasil Introdução. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 421-426, 2011.
- 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. 5, n. 1, p. 75-78, 2007.
- LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M. L. J.; TEDESCO, P. A. . Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 545-567, 2007.
- LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. The intellectual content of taxonomy : a comment on DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 1, p. 65-66, 2003.
- LORENZ, J. G.; JACKSON, W. E.; BECK, J. C.; HANNER, R. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 360, n. 1, p. 1869-1877, 2005.
- LOWE-MCCONNELL, RH. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo, SP.: EDUSP, 1999.
- LUCENA, A. L. M.; RENESTO, E.; OLIVEIRA, C.; MATEUS, R. P.; ZAWADZKI, C. H. Genetic differentiation among ten populations of the genus *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper Paraná River basin. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, n. 1, p. 325–332, 2012.
- LUNDBERG, J. G.; KOTTELAT, M.; SMITH, G. R.; STIASSNY M.; GILL A. C. So many fishes, so little time: An overview of recent ichthyological discovery in continental waters. **Annals Missouri Botanical Garden**, v. 87, n. 1, p.26–62, 2000.
- MAACK R.; **Geografia física do Estado do Paraná**. 3ª ed. Curitiba: Imprensa Oficial, 2002.
- MACARTHUR, R. H. & E. O. WILSON. **The Theory of Island Biogeography**. New Jersey, Princeton University Press, 1967.

MANWELL, C.; BAKER, C. M. a Sibling Species of Sea Cucumber Discovered By Starch Gel Electrophoresis. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 10, n. 1, p. 39–53, 1963.

MATIOLI, S.R., e PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI S.R. e FERNANDES F. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto, SP., 2001.

MOORE, W. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. **Evolution**, v. 49, n. 1, p. 718-726, 1995.

MORITZ, C. Defining “Evolutionarily Significant Units”. **Tree**, v. 9, n. 1, p. 373-375, 1994.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. **PLOS Biology**, v. 2, n. 10, p. e354, 2004.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A.; SCHARF, S.J.; SAIKI R.K.; HORN, G.T.; ERLICH H.A. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. v. 51, n. 1, p. 263-273, 1986.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá, PR.: EDUEM, 2001.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**, 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken, 2006.

NILSSON, C.; REIDY, C. A.; DYNESIUS, M.; REVENGA, C. Fragmentation and flow regulation of the world’s large river systems. **Science**, v. 308, n. 1, p. 405-408. 2005.

OKI, T.; KANAE, S. Global hydrological cycles and world water resources. **Science**, v. 313, n. 1, p. 1068-1072, 2006.

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

ORSI, M. L.; SHIBATTA, O. A.; SILVA-SOUZA, A. T. 2002. Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis. In: MEDRI, ME., BIANCHINI, E., SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (eds). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: EDUEL, 2002, p. 425-442.

PARRA, E. J.; MARCINI, A.; AKEY, J.; MARTINSON, J.; BATZER, M. A.; COOPER, R.; FORRESTER, T.; ALLISON, D. B.; DEKA, R.; FERRELL, R. E.; SHRIVER, M. D. "Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles". **The American Journal of Human Genetics**, v 63, n. 1, p. 1839-1851, 1998.

PARSONS, T.R.; TAKAHASHI, M.; HARGRAVE, B. **Biological oceanographic processes**, 3ª ed, Oxford: Pergamon Press, 1984.

PEGG, G. G.; SINCLAIR, B.; BRISKEY, L.; ASPDEN, W. J. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef , Australia. **Scientia Marina**, v. 70, n. 1, p. 7-12, 2006.

PETTS, G. E. **Impounded rivers: perspectives for ecological management**. New York: J. Wiley & Sons, 1984.

PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; *et al.* Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian journal of biology**, v. 68, n. 4, p. 1039–50, 2008.

QUEIROZ, K. Ernst Mayr and the modern concept of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 1, p. 6600–6607, 2005.

REIS, R.E.; KULLANDER, S. O; FERRARI, C. J., JR. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDPUCRS, 2003.

REUSING, A. F.; RENESTO, E.; ROXO, F. F.; ZAWADZKI, C. H. Allozyme differentiation of two populations of the genus *Neoplecostomus* from the upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 496–501, 2011.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; NAKATANI, K.; FERNANDES, R.; AGOSTINHO, A. A.; BIALETZKI, A. Temporal distribution of ichthyoplankton in the Ivinhema River (Mato Grosso do Sul State / Brazil): Influence of environmental variables. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 427-436, 2011.

RICKLEFS, R. E. A comprehensive framework for global patterns in biodiversity. **Ecology Letters**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2004.

RODRIGUES, L.; HOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Biocenoses em reservatórios: padrões espaciais e temporais**. São Paulo: Rima. p. 97-114, 2005.

RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 4, p. 1026-1033, 2006.

SANTOS, F. R. ; LACERDA, D.R. ; REDONDO, R.A.F. ; NASCIMENTO, A.M.A. ; CHARTONE, E. ; BORBA, E. ; RIBEIRO, R.A. ; LOVATO, M. B. . **Diversidade Genética**. In: DRUMOND, G. M.; MARTINS, C. S.; GRECO, M. B.; VIEIRA, F. (Org.). **Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no estado de Minas Gerais subsídio para o programa Biota Minas**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2009, p. 389-410.

SAVOLAINEN, V.; COWAN, R. S.; VOGLER, A. P.; RODERICK, G. K.; LANE, R. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences**, v. 360, n. 1, p. 1805-1811, 2005.

SHIBATTA, O. A.; GEAL, A.; BENNEMAN, S. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 125-134, 2009.

SHRIVER, M. D.; SMITH, M. W.; JIN, L.; MARCINI, A.; AKEY, J. M.; DEKA, R. e FERRELL, R. E. "Ethnic-affiliation Estimation by Use of Population-specific DNA Markers". **The American Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 1, p. 957-964, 1997.

SIMBERLOFF, D. The role of propagule pressure in biological invasions. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, n. 1, p. 81-102, 2009.

SMITH, D.L.; JOHNSON, K.B. 1996. **A Guide to marine Coastal Plankton and Marine Invertebrate Larvae**. 2nd Ed. Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company. 221p.

SODRÉ, L.M.K.; ALMEIDA, F.S.; CHIARI, L. 2002. **Variabilidade genética em peixes do rio Tibagi através de marcadores moleculares**. In: MEDRI, M.E; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Org). **Estudos integrados da bacia do rio Tibagi**. 1ed. Londrina: Edição dos Editores, p. 531-550.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação: In: MATIOLI R. S., **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001, p. 172-192.

STEVAUX, J. C.; SOUZA-FILHO, E. E.; JABUR, I. C. A história quaternária do rio Paraná em seu alto curso. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (ed.). **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, 1997. p. 47-72.

SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A.; BAILLY, D. *et al.* Inter-annual variations in the abundance of young-of-the-year of migratory fishes in the Upper Paraná River floodplain: relations with hydrographic attributes. **Brazilian journal of biology**, v. 69, n. 2, p. 649-60, 2009.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S.; MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 1, p. 1596- 1599, 2007.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 1, p. 6463-6471, 1989.

TAUTZ, D.; ACRTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 1, p. 70–74, 2003.

TELETCHEA, F. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 19, n. 3, p. 265–293, 2009.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 1, p. 4876-4882, 1997.

TORRES, R. A.; MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F. Genética de Peixes Neotropicais. II. Biologia molecular de Peixes Neotropicais. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 7-5, 2004.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia**. 2 ed, Artmed Editora, Porto Alegre, 2006.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Integration of research and management in optimizing multiple uses of reservoirs : the experience in South America and Brazilian case studies. **Hydrobiologia**, v. 500, n. 1, p. 231-242, 2003.

VANNOTE, R.L; MINSHALL, G.W; CUMMINS, K.W; SEDELL, J.R; CUSHING, C.E. The river continuum concept. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 37, n. 1, p. 130-137, 1980.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia reprodutiva de peixes teleósteis: Teoria e Prática**. Eduem, Maringa, p.169, 1996.

VERMEIJ, G. J. An agenda for invasion biology. **Biological Conservation**, v. 78, n. 1, p. 3-9, 1996.

VIANNA, N. C.; NOGUEIRA, M. G. Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin , Brazil. **Acta Limnoloca Brasiliense**, v. 20, p. 139-151, 2008.

VICARI, M.; PAZZA, R.; ARTONI, R. Cytogenetics and biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçu River. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 297–303, 2006.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V.; FRIJTERS, A.; HORNES, M.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

VRIJENHOEK, R. C. Conservation genetics of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v. 53, n. 1, p. 394-412, 1998.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p329-356, 2009.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. Barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 360, p. 1847–1857, 2005.

WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 29, n. 1, p. 188-97, 2007.

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

WRIGHT, D. H. Species-Energy Theory: An Extension of Species-Area Theory. **Oikos**. v. 41, n. 1, p. 496-506, 1983.

ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; MATEUS, R. P. Allozyme analysis of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the Rio Corumbá, upper Rio Paraná basin, Brazil. **Biochemical genetics**, v. 46, n. 11, p. 755–69, 2008.

ZIOBER, S. R.; BIALETZKI, A.; APARECIDA, L.; MATEUS, D. F. Effect of abiotic variables on fish eggs and larvae distribution in headwaters of Cuiabá River , Mato Grosso State , Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 123-132, 2012.