



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDO YULDI ASHIKAGA

**ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE *Leporinus friderici*  
(CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE) DAS ESCADAS PARA  
TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES DO COMPLEXO CANOAS –  
RIO PARANAPANEMA**

---

Londrina  
2008

**FERNANDO YULDI ASHIKAGA**

**ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE *Leporinus friderici*  
(CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE) DAS ESCADAS PARA  
TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES DO COMPLEXO CANOAS –  
RIO PARANAPANEMA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia Dias.

Londrina  
2008

**FERNANDO YULDI ASHIKAGA**

**ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE *Leporinus friderici*  
(CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE) DAS ESCADAS PARA  
TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES DO COMPLEXO CANOAS –  
RIO PARANAPANEMA**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ana Lucia Dias.  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Leda Maria Koelblinger Sodré.  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Erasmo Renesto  
Universidade Estadual de Maringá

Londrina, 28 de fevereiro de 2008.

**Dedico aos meus pais, Massao Ashikaga e Satiko Ivano Ashikaga, por tudo o que representam para mim.**

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Londrina** e ao **programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular** pela minha formação acadêmica.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado.

À **Duke Energy International – Geração Paranapanema e Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEL)** pelo apoio financeiro ao projeto “Análise genética de espécies de peixes migradoras através de marcadores moleculares” e à equipe técnica de meio ambiente da Duke Energy International, pelo auxílio nas coletas realizadas nas escadas de transposição de peixes.

À **Profa. Dra. Ana Lúcia Dias**, por acreditar e confiar em mim, obrigado pela chance de mostrar minha capacidade.

À **Profa. Dra. Leda Maria Koelblinger Sodré**, eterna professora, orientadora, amiga e mãe por consideração. Agradeço toda a confiança, ajuda e atenção concedida. De uma orientadora, sempre se espera resposta, de uma amiga, sempre se espera apoio, de uma mãe, sempre se espera carinho. Sendo assim, nunca poderia deixar de te agradecer por todos esses anos, e dizer que se cheguei até aqui, foi porque você permitiu. Muito obrigado.

À **Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia**, um exemplo de profissional a ser seguido. Muito obrigado pelos vários momentos de descontração e compenetração, de onde vários problemas foram solucionados e muitas questões respondidas.

À **Profa. Dra. Fernanda Simões de Almeida**, pela amizade, cumplicidade e parceria. Sem você, este trabalho não existiria, ou pelo menos não de forma tão divertida. Valeu Fer!

Ao **Prof. Dr. Mário Luis Orsi**, pelas valiosas dicas, sugestões e ajuda neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Erasmo Renesto**, por aceitar o convite para formar a banca examinadora deste trabalho e pelas considerações realizadas.

Ao **Prof. Dr. Rogério F. de Souza**, pela ajuda prestada a este trabalho, muito obrigado.

À **Profa. Dra. Ilce Mara Syllus Cólus**, coordenadora do programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, obrigado pela oportunidade.

Ao **Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas**, cujas sugestões serão acatadas e melhorias realizadas.

À **Profa. Dra. Maria Helena P. Fungaro**, pela oportunidade de conhecer outras áreas de estudo, pelos ensinamentos e pelo profissionalismo que tanto respeito.

Aos técnicos **Edson Santana da Silva, Aparecido de Souza, Dário Tormena e Melissa Costa**, por facilitarem a realização deste trabalho, sempre fornecendo o suporte necessário.

À **Sueli Miranda**, secretária do Curso de Mestrado em Genética Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, pela ajuda e atenção concedida.

Aos meus amigos de graduação: **Alexandre, Armando, Breno, Bruno Blotta, Daniel, Erick, João, Marcio, Mauricio, Paulo e Rodrigo Cupelli**; e as amigas: **Ana Lúcia, Andressa, Ariane, Camila, Carla, Dalita, Erica Kavati, Juliana, Helen, Ivana e Marisa**.

A formação do caráter de uma pessoa é sempre construída pelos pais e moldada pelos amigos. Sendo assim, considero estes, os melhores exemplos para uma pessoa se espelhar.

Aos amigos de laboratório, desde os antigos: **Fram, Karen, Bruno Galindo e Juliano**, até os mais novos: **Vanessa, Fran, Gabriele, Rafa, Douglas, Leandro e Olavo**. Obrigado minha gente, por tudo o que fizeram por mim. Ambiente melhor para trabalhar do que neste laboratório ainda está pra nascer.

À **Daniele Sartori, Lara, Carla Beatriz, Ligia, Juliana Laino, Karen Brajão, Patricia Suzuki e Leandro**, obrigado pela convivência, amizade e pela experiência de conhecer novas áreas de trabalho.

Às irmãs **Larissa e Carla Bettin Pires**, como se fosse possível resumir em palavras, tudo o que representam para mim, obrigado por toda amizade e carinho. Independente do rumo que a vida nos leva, sempre me lembrarei de como foi fácil e prazeroso ser amigo de vocês!

Aos santacruzenses **Fernando, Bruno, Murilo, Juliano, Diego e Fábio**. Amigos de longa data e companheiros para toda a vida. Obrigado.

Aos meus irmãos, **Fabio e Daniele**, meu cunhado **André**, meus sobrinhos **Lucas e Isabele**, minha **avó dona Rosa**, e a toda minha **família**, por todo o apoio e carinho que uma família possa representar. Muito obrigado por serem meu chão e meu porto seguro.

Aos meus pais **Massao e Satiko**. Palavras me faltam para explicar tudo que vocês significam para mim, sem vocês, absolutamente nada disso seria possível. Eu os amo, hoje e sempre!

À **Deus**, cujos cientistas teimam em usar a razão para explicar a vida, mas sem a fé em ti, nada seria possível.

**MUITO OBRIGADO!!!**

ASHIKAGA, Fernando Yuldi. **Estudo da estrutura genética de *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) das escadas para transposição de peixes do complexo Canoas – Rio Paranapanema.** 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

As barragens construídas ao longo de sistemas hídricos interrompem a dispersão e a migração dos organismos aquáticos, afetando principalmente a abundância das espécies de peixes migradores. Mecanismos para transposição foram construídos em barragens visando minimizar esses impactos. Poucas são as informações disponíveis sobre o efeito da construção de barragens na estrutura genética populacional da fauna Neotropical de peixes migradores. A conservação da diversidade genética é de fundamental importância para sobrevivência de uma espécie a longo tempo, pois a manutenção de um *pool* gênico com variabilidade suficiente faz-se necessário para a adaptação da espécie a alterações ambientais. Nesse contexto, marcadores moleculares RAPD e microssatélites, foram utilizados para avaliar a diversidade e estrutura genética da espécie migradora *Leporinus friderici* no Complexo Canoas – rio Paranapanema – Brasil. Sete grupos foram amostrados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II durante o período reprodutivo em três anos consecutivos. Ambos os marcadores evidenciaram uma alta diversidade genética para esses grupos. Os marcadores microssatélites mostraram uma perda de heterozigosidade e uma baixa taxa de endocruzamento para a espécie. A diferenciação genética encontrada entre os grupos, com ambos os marcadores utilizados, pode ser considerada de baixa a moderada. Os dados obtidos com os parâmetros de diversidade genética (distância e identidade genética, *FST* e AMOVA) permitiram concluir que os grupos de *L. friderici* do Complexo Canoas estão estruturados como uma única população. Os dados obtidos sobre a diversidade genética e estrutura populacional de *L. friderici* são de grande importância para o desenvolvimento de programas de manejo e conservação da espécie no Complexo Canoas, podendo também ser utilizados em programas de aquicultura.

**Palavras-chave:** Escadas de transposição. RAPD. Microssatélites. Estrutura populacional.

ASHIKAGA, Fernando Yuldi. **Study of genetic structure of *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) in fish passage ladders from Canoas complex – Paranapanema River.** 2008. 75p. Dissertation (Master Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

### ABSTRACT

The dams built along systems of water interrupt the dispersion and the migration of the aquatic organisms affecting mainly the abundance of the species of fish migraters. Mechanisms for transposition were built in dams seeking to minimize those impacts. Little are the available information on the effect of the construction of dams in the population genetic structure of the fauna Neotropical of fish migraters. The conservation of the genetic diversity is of fundamental importance for survival of a species at long time because the maintenance of a genic pool with enough variability is made necessary for the adaptation of the species to environmental alterations. In that context, molecular markers RAPD and microsatellites, were used to evaluate the diversity and structure genetics of the migraters species *Leporinus friderici* in the “Complexo Canoas” – Paranapanema river - Brazil. Seven groups were collected in the ladder for transposition of fish of HPS Canoas I and Canoas II during the reproductive period in three consecutive years. Both markers evidenced a high genetic diversity for those groups. The markers microsatellites showed a loss of heterozygosity and a considerable inbreeding tax for the species. The genetic differentiation found among the groups with both used markers can be considered low until moderate. The data obtained with the parameters of genetic diversity (distance and genetic identity, *FST* and AMOVA) allowed to conclude that the groups of *L. friderici* of the “Complexo Canoas” are structured as a single population. The data obtained on the genetic diversity and population structure of *L. friderici* are of great importance for the development of handling programs and conservation of the species in the “Complexo Canoas” and could also be used in aquaculture programs.

**Keywords:** Fish ladder. RAPD. Microsatellites. Population structure.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1** – Mapa mostrando a drenagem do rio Paranapanema, da nascente a foz, destacando o Complexo Canoas em sua porção média. A = UHE Canoas I e B = UHE Canoas II..... 28
- Figura 2** – Exemplar de *Leporinus friderici*, capturado no Complexo Canoas – rio Paranapanema..... 30

### ARTIGO

- Figura 1** – Visão parcial do Rio Paranapanema e seus principais afluentes (rios Tibagi e das Cinzas). Em destaque, os dois locais de coleta: UHE Canoas I e UHE Canoas II ..... 40
- Figura 2** – Frequências alélicas para o loco Lmac02 para os grupos de *Leporinus friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II- rio Paranapanema..... 49
- Figura 3** – Frequências alélicas para o loco Lmac05 para os grupos de *Leporinus friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II- rio Paranapanema..... 49
- Figura 4** – Frequências alélicas para o loco Lmac06 para os grupos de *Leporinus friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II- rio Paranapanema..... 50
- Figura 5** – Frequências alélicas para o loco Lmac07 para os grupos de *Leporinus friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II- rio Paranapanema..... 50

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

- Tabela 1** – Grupos de *Leporinus friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes das UHEs de Canoas I e Canoas II e número de exemplares analisados para os marcadores de RAPD e microssatélites..... 39
- Tabela 2** – Seqüência de nucleotídeos das repetições *motifs* e dos *primers* flanqueadores para os locos de microssatélite analisados para *Leporinus friderici* das escadas de transposição para peixes do Complexo Canoas ..... 42
- Tabela 3** – Diversidade genética intra-populacional utilizando marcadores RAPD para os grupos de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema..... 46
- Tabela 4** – Distância genética (diagonal abaixo) e identidade genética (diagonal acima) utilizando marcadores RAPD entre os grupos de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 – 4 em azul) e Canoas II (5 – 7 em vermelho) – rio Paranapanema..... 47
- Tabela 5** – Análise da variância molecular (AMOVA) e  $F_{ST}$ , utilizando marcadores RAPD entre os grupos de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHEs de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema..... 47
- Tabela 6** – Análise da variância molecular (AMOVA) e  $F_{ST}$ , utilizando marcadores RAPD para a população de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHEs de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema..... 48
- Tabela 7** –  $F_{ST}$  par a par, obtidos utilizando marcadores RAPD, entre os grupos de *Leporinus friderici* das escadas de transposição para peixes das UHEs Canoas I (1 – 4) e Canoas II (5 – 7) – rio Paranapanema..... 48
- Tabela 8** – Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) intraloco e probabilidade para o Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (PHW) para os quatro locos microssatélite nos grupos de *Leporinus friderici* das escadas de transposição para peixes das UHEs Canoas I (1 - 4) e Canoas II (5 - 7) – rio Paranapanema..... 51

<b>Tabela 9</b> – Índices de diversidade genética intrapopulacional obtidos com marcadores microssatélites para os grupos de <i>Leporinus friderici</i> das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.....	52
<b>Tabela 10</b> –Análise da variância molecular (AMOVA), $F_{ST}$ e $F_{IS}$ , utilizando marcadores microssatélite entre os grupos de <i>Leporinus friderici</i> das escadas para transposição de peixes das UHEs de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema .....	53
<b>Tabela 11</b> – $F_{ST}$ par a par, obtidos com marcadores microssatélites, entre os grupos de <i>Leporinus friderici</i> das escadas de transposição para peixes das UHEs Canoas I (1 – 4) e Canoas II ( 5 – 7) – rio Paranapanema.....	53
<b>Tabela 12</b> –Análise da variância molecular (AMOVA), $F_{ST}$ e $F_{IS}$ , utilizando marcadores microssatélite para a população de <i>Leporinus friderici</i> das escadas para transposição de peixes das UHEs de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema .....	54

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1.1 Importância dos Peixes.....	15
1.1.2 Variabilidade Genética e Estrutura Populacional.....	17
1.1.3 Marcadores Moleculares .....	19
1.1.4 Barragens e Escadas para Transposição de Peixes.....	22
1.1.5 Rio Paranapanema e Complexo Canoas.....	26
1.1.6 Considerações sobre <i>Leporinus friderici</i> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3 ARTIGO</b> .....	33
Resumo .....	35
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	39
Coleta de Amostras.....	39
Extração e Quantificação do DNA .....	41
Amplificação do DNA.....	41
Marcadores RAPD.....	41
Marcadores Microsatélites .....	41
Análise Eletroforética .....	43
Marcadores RAPD.....	43
Marcadores Microsatélites .....	43
Análise Genética.....	44
Marcadores RAPD.....	44
Marcadores Microsatélites .....	45
Resultados.....	46
Marcadores RAPD.....	46
Marcadores Microsatélites .....	48
Discussão.....	55
Referências Bibliográficas.....	65
<b>REFERÊNCIAS GERAL</b> .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

O processo de construção de barragens e conseqüente formação de reservatórios para fins hidroelétricos conduzem a alterações das características físicas, químicas, sanitárias e biológicas do rio, modifica a intensidade, duração e época das cheias, reduzindo os nutrientes disponíveis e as áreas sazonalmente alagáveis criando, nos segmentos imediatamente abaixo, condições térmicas e hidrodinâmicas muito instáveis. Além disso, a

construção dessas barragens intercepta a rota migratória de diversas espécies causando impactos sobre a capacidade biogênica do sistema, disponibilidade de alimento e abrigo para formas jovens de peixes (THOMAZ et al., 1997; AGOSTINHO; GOMES, 2005).

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

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

A construção de hidroelétricas destrói habitats e aumenta a fragmentação geográfica de muitas espécies de peixe. A redução no fluxo genético pode mudar a relação de componentes de diversidade até mesmo entre e dentro de populações. Frequentemente, populações de peixes de água doce possuem distribuição em lugares isolados, o que pode minimizar o fluxo de gene entre elas, ocasionando processos de diferenciação genética. Portanto, avaliações da estrutura genética de populações tornam-se necessárias, pois permitem extrair importantes informações a respeito das populações naturais e para a elaboração de planos de manejo (cf. LOPES et al., 2007).

Pertencente à ordem Characiformes, família Anostomidae, subfamília Anostominae, *Leporinus friderici* (BLOCH, 1974), comumente conhecido como aracu, piava ou piau três pintas, é um peixe migrador e apresenta uma ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo no Suriname, bacia Amazônica, rios do Nordeste, bacias do rio Paraná, Paraguai e do Prata (GODOY, 1987). A ordem Characiformes, juntamente com a de Siluriformes, representam mais de 85% da ictiofauna dos rios Neotropicais, havendo leve predomínio dos Characiformes (GARAVELLO; BRITSKI, 2003). Os anostomideos podem ser de pequeno, médio ou grande porte, tendo grande importância para a pesca comercial e esportiva, além de serem espécies potenciais para o desenvolvimento da piscicultura (DUKE ENERGY, 2003). Embora os peixes da família Anostomidae demonstrem alta plasticidade

alimentar e ampla distribuição, a estreita relação entre seu alimento e as regiões marginais dos ambientes aquáticos pode estar colocando em risco o futuro deste grupo pela destruição destas regiões (ORSI, 2005).

Técnicas moleculares como isoenzimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites, entre outras, têm sido amplamente utilizadas para estudos da diversidade e estrutura genética de peixes neotropicais, não somente para fins econômicos, mas também para preservação e manutenção da biodiversidade (TORRES et al., 2004; PAIVA et al., 2006; AFFONSO; GALETTI, 2007).

## **1.1 REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1.1 Importância dos Peixes**

De acordo com Martins e Tamada (2000) o Brasil, com extensão territorial superior a oito milhões de km<sup>2</sup>, é um país privilegiado em recursos hídricos com cerca de 20% da água doce mundial e a maior das bacias hidrográficas (Amazônica), e mundialmente reconhecido pela sua importante biodiversidade, possuindo mais de 3.000 espécies de peixes. Muitas dessas espécies, cerca de 20%, migram e não recebem a atenção merecida quanto à preservação e manutenção.

Ormerod (2003) destaca que os peixes estão entre os recursos naturais mundiais mais importantes e que, se a importância econômica não é suficiente para enfatizar o valor que os peixes apresentam, deve-se considerar a importância intrínseca de sua conservação. Essa importância está na biodiversidade e ciclos de vida que apresentam, na ecologia comportamental, nas interações ecológicas e nas adaptações fisiológicas desenvolvidas ao longo da evolução, além da potencial utilidade que muitas espécies oferecem no manejo de ecossistemas (controle de insetos vetores, manejo de vegetação invasora e em biomanipulações usadas para restaurações de sistemas aquáticos). Além disso, os peixes são reconhecidos pelo importante papel que cumprem nos processos do ecossistema, os quais incluem cadeia trófica, transferência de energia entre níveis.

Hilsdorf e Petrere (2002) relatam em seu trabalho que peixes representam

mais da metade (51%) de todos os vertebrados vivos. Das cerca de 25 mil espécies descritas, quase 10 mil vivem em águas doces. Esse grupo de vertebrados é importante não só pela quantidade de espécies, mas também por ser uma relevante fonte de proteínas para várias comunidades humanas. Estes autores constatam ainda que, apesar da grande importância dos peixes para o homem, pouco se conhece sobre sua diversidade. Estima-se que 20% da ictiofauna de água doce do mundo estejam extintos ou ameaçados.

Dados da FAO (2004) (*Food and Agriculture Organization of United Nations*) em seu documento bianual, denominado SOFIA (*The State of World Fisheries and Aquaculture*), mostram a importância econômica dos peixes. Este documento relata que somente em 2002, ao redor de 93 milhões de toneladas da produção de peixes foram retiradas diretamente de populações naturais em mares e águas continentais de todo o mundo, e que 42 milhões de toneladas foram retirados da aquicultura. Mostra também que, por volta de 101 milhões de toneladas, do total combinado de capturas em 2002, foram utilizados diretamente como alimento, equivalendo a 16 kg de peixe *per capita*, ou 15% do total de proteína animal de que o homem necessita. De acordo com este mesmo documento, 35 milhões de pessoas são empregadas diretamente na pesca, com esta atividade movimentando, no ano amostrado, 58 bilhões de dólares no mercado internacional, sendo este montante maior que o produto interno bruto de mais de 70% das nações do mundo.

Peixes e outros organismos marinhos são os únicos animais selvagens consumidos pela espécie humana, em grande escala, através da exploração direta de populações naturais. Assim, os problemas (e as soluções) encontrados na sua exploração são completamente diferentes daqueles oriundos da exploração das plantas e animais domésticos (SOLÉ-CAVA, 2001).

Justamente por isso é que os estoques naturais de peixes têm sofrido sensível redução nos cursos d'água, como resultado da exploração desordenada dos recursos, pela captura de indivíduos jovens, pela pesca predatória, falta de fiscalização e medidas protecionistas e, principalmente, pela crescente fragmentação dos rios devido à construção de empreendimentos hidrelétricos, que modificam as áreas de desova coletivas e interrompem o trajeto de algumas espécies. Desta maneira, torna-se fundamental o conhecimento da biologia e da dinâmica populacional destes animais à tomada de medidas racionais na preservação dos estoques (AGOSTINHO; GOMES, 1997; HAHN et al., 1998; HILSDORF; PETRERE, 2002; AGOSTINHO et al., 2002; MARCIANO, 2005; RIBEIRO F., 2006; SILVA, 2006).

### 1.1.2 Variabilidade Genética e Estrutura Populacional

A estrutura genética refere-se à distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e no tempo resultante da ação de forças evolutivas tais como: mutação, migração, seleção natural e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie e população. A variação genética, a matéria-prima na qual a seleção natural age, é criada continuamente através da mutação e ao mesmo tempo erodida através de seleção e da deriva genética. A habilidade de uma espécie em responder a seleção é dependente da presença de variações herdáveis. Se a variação genética estiver presente dentro de uma espécie, qualquer alteração nas pressões seletivas devido a mudanças ambientais permitirá que alguns indivíduos possam sobreviver e se reproduzir (LOWE et al., 2004).

Segundo os autores acima citados, a variação genética dentro de uma espécie é um conceito fundamental para a genética aplicada à ecologia e possui três componentes: diversidade genética, diferenciação genética e distância genética. A diversidade genética mede a quantidade de variação encontrada numa população, a diferenciação genética descreve como esta variação é dividida entre populações. A distância genética quantifica o grau de similaridade entre dois indivíduos, ou grupo de indivíduos, sejam estas populações ou mesmo espécies.

Rubin et al. (2001), sugerem pelo menos três razões biológicas para a preservação da variabilidade genética de populações naturais como objetivo da biologia da conservação: a perda da variabilidade pode aumentar a probabilidade de extinção através de um declínio na fecundidade e viabilidade; populações com baixos níveis de variação genética, sobre as quais a seleção natural pode operar, podem ter oportunidades reduzidas para futuras adaptações frente a mudanças evolutivas; e, a preservação da variabilidade genética pode ter papel chave na identificação de unidades evolutivas significativas para a conservação.

Populações naturais são dinâmicas em muitas dimensões, mudam de tamanho, densidade e localização em função do tempo e, em função do espaço, as populações podem fragmentar-se em muitas subpopulações ou fundir-se com outras (HEY; MACHADO, 2003). Populações de muitas espécies são frequentemente subdivididas por fatores geográficos, ecológicos e comportamentais (GENOVART et al., 2003).

O grau no qual uma população pode ser delimitada de outras depende do nível de fluxo gênico entre elas (FUTUYMA, 1997). O fluxo gênico é dependente da taxa de migração entre as populações. E a taxa de migração depende do número de populações que se

encontram dentro da região, da distribuição geográfica, do padrão espacial, da distancia entre elas e da habilidade de dispersão da espécie (FRANKHAN et al., 2002). O fluxo gênico entre os grupos homogeniza a variação genética entre eles (GENOVART et al., 2003). Quando a taxa de fluxo gênico é baixa ou nula, os efeitos da deriva podem ser mais facilmente visíveis na diferenciação das populações (SLATKIN; BARTON, 1989).

As populações fragmentadas podem apresentar-se com diversas estruturas: 1) como populações inteiramente isoladas sem nenhum fluxo gênico; 2) como vários agrupamentos entre os quais o fluxo gênico é suficiente para que se comportem como uma única e grande população genética; 3) seguindo o modelo de ilhas onde a taxa de migração é igual entre ilhas de igual tamanho e distancia; 4) de acordo com o modelo de “*stepping-stones*”, onde há fluxo gênico entre populações vizinhas; 5) baseado no modelo fonte-sumidouro, onde há uma ilha maior que é fonte de migração de indivíduos para ilhas menores; 6) e seguindo o modelo de metapopulações, onde há varias populações com freqüentes eventos de extinção e recolonização (FRANKHAN et al., 2002; DANTAS, 2007).

Estudos de genética de populações vêm aumentando consideravelmente nas últimas décadas. Marcadores moleculares têm sido amplamente aplicados para acessar a repartição genética entre as populações geograficamente isoladas, para definir unidades evolutivas significativas abaixo do nível de espécies, para propostas de manejo e conservação e para revisar tradicionais designações de espécies e subespécies (DANTAS, 2007).

De acordo com Perez-Sweeney et al. (2003), avaliações da estrutura populacional fornecem um retrato genético das populações, fornecendo estimativas de endogamia, diversidade genética e diferenciação entre os espécimes. Esses dados associados ao conhecimento de atributos como o tamanho efetivo da população fluxo gênico e os sistemas de acasalamento são particularmente importantes no delineamento das ações de manejo a serem adotadas.

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

### 1.1.3 Marcadores Moleculares

Inferências sobre fluxo gênico, variabilidade e estrutura genética em populações naturais podem ser feitas através de diversas técnicas de biologia molecular disponíveis para a detecção de polimorfismos genéticos ao nível de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Segundo esses autores, o desenvolvimento da tecnologia da reação de polimerase em cadeia (*PCR – Polymerase Chain Reaction*), causou uma revolução na biologia como ferramenta poderosa para estudos moleculares, envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo.

A técnica de PCR foi utilizada diretamente em muitos estudos e, desde a sua descrição, técnicas derivadas da mesma têm sido amplamente publicadas e utilizadas. Uma das técnicas derivada é o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990), que utiliza iniciadores (*primers*) curtos, com cerca de 10 a 11 nucleotídeos, e de seqüência arbitrária.. A probabilidade de amplificação de diferentes fragmentos anônimos do DNA genômico é grande, com cada fragmento (presumidamente) representando locos diferentes (LIU; CORDES, 2004).

Williams et al. (1990) caracterizaram como dominante o comportamento genético (segregação mendeliana) dos marcadores de RAPD. A principal limitação na utilização do marcador RAPD é a sua característica dominante, onde a presença da banda ocorre tanto para os genótipos homozigotos como para heterozigotos, sendo difícil distinguir um genótipo do outro através da intensidade da banda produzida (ALI et al., 2004; LIU; CORDES, 2004).

Conforme Zucchi (2002), este tipo de marcador possibilita uma amostragem aleatória mais ampla do genoma, do que a proporcionada por outros métodos convencionais. Alguns modelos estatísticos foram desenvolvidos no sentido de contornar as limitações, permitindo a estimativa de parâmetros populacionais com a utilização de marcadores dominantes (EXCOFFIER et al., 1992; LYNCH; MILLIGAN, 1994). De acordo com tais modelos, deve-se assumir que os alelos dos diferentes locos não co-migram para a mesma posição em um gel e que os grupos populacionais estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (LYNCH; MILLIGAN, 1994).

Marcadores moleculares de herança dominante, como o RAPD, são aqueles que não permitem a detecção dos indivíduos heterozigotos em uma análise, os quais poderão ter sua frequência estimada pelo teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes marcadores são

amplamente utilizados devido a suas altas taxas de mutação, o que permite uma evolução mais rápida tornando-os úteis para estudos de indivíduos, famílias e populações, enquanto que marcadores que possuem uma taxa de mutação menor evoluem mais lentamente e são utilizados nos estudos de espécies e táxons supra específicos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SOLÉ-CAVA, 2001; TORRES et al., 2004).

A simplicidade e rapidez na obtenção de resultados são vantagens da técnica de RAPD. Além disso, a possibilidade de utilização de um conjunto único de *primers* no estudo de qualquer organismo, a quantidade mínima de DNA necessária nas análises, a possibilidade de se amostrar regiões de DNA repetitivo nos genomas e o baixo custo em relação a outras técnicas moleculares para obtenção de marcadores, tem possibilitado amplamente a utilização da técnica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TORRES et al., 2004).

A utilização de marcadores RAPD em estudos populacionais de peixes tem sido ampla, são citados aqui alguns exemplos, principalmente na ictiofauna neotropical: Almeida et al. (2001) estudaram três espécies da família Pimelodidae; Chiari e Sodré (2001) cinco espécies da família Anostomidae; Almeida et al. (2003) populações de *Pimelodus maculatus*; Hassanien et al. (2004) com *Tilapia nilotica*; Wasko et al. (2004) populações de *Brycon cephalus*; Jayasankar (2004) com peixes da família Pomacentridae; Huang et al. (2005) com híbridos de diferentes espécies de bagre; Oliveira et al. (2006a) com *Cichla spp.*; Paiva et al. (2006) com *Astyanax bimaculatus*; Affonso e Galetti (2007) com peixes da família Pomacanthidae e Chaetodontidae; Lopes et al. (2007) com *Salminus brasiliensis*; Sanches e Galetti (2007) com *Brycon hilarii*.

Microssatélites, também conhecidos como seqüências simples repetidas (SSRs - *Single Sequence Repeats*) ou repetições curtas em *tandem* (STRs - *Short Tandem Repeats*), representam um tipo único de seqüências genômicas de DNA não codificante repetidas em *tandem*, as quais são distribuídas abundantemente pelo genoma eucariótico e demonstram altos níveis de polimorfismo alélico (cf. OLIVEIRA et al., 2006b). São marcadores codominantes onde as seqüências repetidas são de tamanho relativamente pequeno (seqüências curtas de 1 – 6 pb) que podem ser amplificadas facilmente pela reação da polimerase em cadeia (PCR). Os microssatélites geralmente estendem-se de vinte a algumas centenas de bases (cf. CHISTIakov et al., 2006).

Dentro da classe de marcadores moleculares existentes, os microssatélites são os que ocorrem em maior freqüência e são aleatoriamente distribuídos pelo genoma. As estimativas da taxa de mutação de microssatélites em *E. coli* em sistemas *in vivo* são elevadas

(10<sup>-2</sup>), quando comparadas à taxa de mutação de ponto que ocorre na ordem de 10<sup>-9</sup> e 10<sup>-10</sup> (HANCOCK, 2000). Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a alta taxa de mutação dos microssatélites gerando a variação no número de repetições em *tandem*: erros durante a recombinação, eventos de *crossing-over* desiguais e deslizamento da DNA polimerase durante a replicação ou reparo (OLIVEIRA et al., 2006b).

A distribuição dos microssatélites no indivíduo é função da história de evolução no genoma e dos efeitos da pressão de seleção. Os locos SSR parecem ser geneticamente estáveis, possuem expressão codominante, são altamente multialélicos e apresentam segregação mendeliana. Em uma população, todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados, fazendo com que os microssatélites estejam entre os marcadores moleculares mais apropriados para mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FUNGARO; VIEIRA, 2001; OLIVEIRA et al., 2006b).

Quando seqüências únicas que flanqueiam um dado microssatélite são conhecidas, *primers* complementares podem ser sintetizados e utilizados como iniciador loco-específico em reações de PCR. A detecção de seqüências SSR, via PCR, é feita por meio da técnica de eletroforese utilizando gel de poliacrilamida, sendo necessário um gel adequado para a separação de segmentos que diferem por poucos pares de bases. Os produtos de amplificação de diferentes indivíduos, visualizados após a eletroforese geralmente diferem em tamanho em função de serem freqüentes na população diferenças no número de unidades de repetições no loco de microssatélite. Cada unidade de microssatélite assim detectada é um loco polialélico e, em um indivíduo diplóide, a amplificação de um loco resultará em uma ou duas bandas, respectivamente, dependendo se é um homocigoto ou heterocigoto (FUNGARO; VIEIRA 2001).

Um dos grandes problemas na utilização desses marcadores é o grande volume de trabalho necessário e o alto custo para o desenvolvimento de *primers* específicos para um dado loco de microssatélite de uma espécie. Porém, tem sido observado que ocorre conservação de sítios de microssatélite entre espécies relacionadas. É possível, portanto, aproveitar *primers*, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nas demais espécies do gênero ou gêneros da mesma família; esse atributo dos microssatélites é conhecido como transferabilidade ou amplificação espécie cruzada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ZUCCHI, 2002; CHISTIYAKOV et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006b)

Os microssatélite apresentam vantagens sobre os métodos clássicos da genética na análise da estrutura genética de populações, tais como: a herança das características detectadas pode ser facilmente demonstrada, a maioria dos locos é codominante e as frequências alélicas podem ser calculadas diretamente sem a necessidade de delineamentos genéticos; as estimativas da variabilidade genética podem ser comparadas diretamente entre populações ou espécies e um conjunto de locos pode ser acessado usando-se uma pequena quantidade de material. A utilização de microssatélite, pela sua neutralidade, apresenta como principal vantagem a possibilidade de caracterização de forças evolutivas sem a influência da seleção, permitindo maior compreensão do comportamento das populações naturais, em termos de deriva genética e migração (CHISTIYAKOV et al., 2006). Apesar da importância dos microssatélites para estudos de evolução e conservação genética, relacionam-se três pontos que merecem ser levados em consideração: a heterozigosidade tende a ser alta dentro das populações, o que acaba produzindo baixa diferenciação entre elas; os locos são extremamente sensíveis à redução do tamanho populacional podendo gerar, portanto, elevadas distâncias genéticas; e, como os marcadores são neutros, as diferenças estatísticas significativas podem não estar correlacionadas com diferença biológicas expressivas, tanto pela falta de correlação entre os locos adaptativos e os locos altamente variáveis, como também pelo poder estatístico intrínseco desses locos, que é bastante elevado (KARASAWA, 2005).

Com bases nessas informações, devem-se escolher marcadores que podem indicar taxas altas de mutações, pois se escolhermos um marcador que evolui de forma demasiadamente lenta para o nível estudado, teremos pouca variabilidade e uma saturação plesiomórfica nos dados (ou seja, todas as semelhanças observadas serão devidas à ancestralidade dos alelos, e não haverá eventos novos capazes de discriminar os grupos estudados) (SOLÉ-CAVA, 2001).

#### **1.1.4 Barragens e Escadas para Transposição de Peixes**

Conforme Nogueira et al. (2005), a construção de reservatórios ao longo do século XX caracterizou-se por grandes empreendimentos localizados em diversos continentes, o que levou à regulação de imensos volumes de água e à inundação de áreas em torno de 400.000 km<sup>2</sup>. Nos últimos anos essa tendência diminuiu significativamente nos países

desenvolvidos, embora naqueles em desenvolvimento, ainda seja freqüente a formação de represas com o objetivo de fomentar o desenvolvimento socioeconômico.

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

Os reservatórios são corpos de água cuja estrutura e dinâmica têm organização intermediária entre a de um rio e a de um lago. Assim, os processos vigentes nos represamentos são mais complexos e variáveis. Variações temporais ou espaciais no fluxo da água através de reservatórios podem, por exemplo, alterar o sentido predominante do eixo ao redor do qual os processos se organizam, passando de vertical para horizontal, e vice-versa. Mesmo reservatórios dispostos em série em uma mesma bacia, embora com interações unidirecionais de montante para jusante, mostram suas comunidades com organizações diferenciadas (AGOSTINHO; GOMES, 1997).

Segundo Hilsdorf e Petrere (2002), se por um lado os reservatórios formados geram energia elétrica, fornecem água e controlam enchentes em áreas ribeirinhas, por outro afetam diretamente a sobrevivência das comunidades de peixes. A interrupção de rios por barragens altera os fluxos de água, de sedimentos e de nutrientes, o que perturba drasticamente a dinâmica dos processos hídricos de uma bacia. Barragens também interferem no ciclo de vida de organismos aquáticos e produzem alterações importantes nos ecossistemas ribeirinhos. A mudança de ambiente lótico (água corrente) para lêntico (água parada) afeta os peixes de várias maneiras: interrompe rotas migratórias e elimina obstáculos naturais, importantes para a reprodução de espécies de piracema; regulariza a vazão do rio, fator que influencia o ciclo reprodutivo de peixes que desovam em ninhos; reduz a vegetação ciliar, importante fonte de alimento; e causa o desaparecimento das lagoas marginais, fundamentais para a eclosão de ovos e para a fase juvenil de muitas espécies de peixes.

A construção de barragens exige adoção de medidas, que reduzam os impactos sobre as populações de peixes durante e após a formação do reservatório. Várias ações têm sido utilizadas para preservar essa fauna em rios “divididos” por barragens. Algumas, como construir escadas e elevadores para transposição de peixes, transportar (em veículos) os peixes da área abaixo da barragem para o reservatório ou mesmo implantar estações de piscicultura para reproduzir espécies nativas para futuros repovoamentos, têm sido testadas em todo o mundo (AGOSTINHO; GOMES, 1997; HILSDORF; PETRERE, 2002; AGOSTINHO et al., 2002; AGOSTINHO; GOMES, 2005).

Em seu trabalho em 2005, Agostinho e Gomes afirmam que a preocupação com os efeitos das barragens na movimentação de peixes ao longo dos rios, foi a primeira importante motivação manifestada pelo Estado para a proteção dos recursos pesqueiros. O sucesso das escadas para peixes na transposição de cardumes de salmão na América do Norte, estimulou os legisladores brasileiros a produzirem o primeiro documento legal importante relacionado ao assunto no Brasil. Isto é, a Lei nº. 2250, do Estado de São Paulo (28/12/1927), que em seu Artigo 16 tornava obrigatória a instalação de escadas para transposição de peixes em todas as barragens daquele estado. A partir de então, outros documentos ligados à proteção da fauna aquática foram produzidos. Em 1934, por exemplo, uma lei federal ampliou a obrigatoriedade das escadas para o país. Em 1938, nova lei determinava que as barragens devessem ter mecanismos que permitissem a preservação da ictiofauna, pela construção de escada de peixes ou estação de piscicultura. Dados os resultados insatisfatórios das escadas, as concessionárias hidrelétricas passam a construir essas estações e a contratar pessoal efetivo à piscicultura.

Em 1967, o Decreto-Lei nº. 221 (28/02/1967) delegou à Superintendência para o Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE) a tarefa de determinar o melhor mecanismo para a proteção da fauna aquática. A SUDEPE, que tinha por principal finalidade o desenvolvimento da aquicultura, tornou obrigatória, por intermédio da Resolução 46 (27/01/1971), a construção de uma estação de piscicultura em cada sub-bacia, onde reservatórios fossem construídos (ALZUGUIR, 1994). Em 1977, foi determinado pela antiga Superintendência do Desenvolvimento da Pesca (hoje incorporada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) que, qualquer entidade envolvida na construção de barragens deve adotar sistemas ou métodos de proteção e conservação dos recursos biológicos aquáticos: “todos quantos, para qualquer fim, represarem as águas dos rios, ribeirões e córregos, são obrigados a construir escadas que permitam a livre subida dos peixes”. Ao se generalizar à obrigatoriedade de uma obra, cujo funcionamento resulta de interações entre suas características técnicas (tipo, declividade, vazão, posição em relação ao eixo da barragem, etc.) e a natureza da ictiofauna presente, sem o necessário conhecimento técnico- científico do empreendimento ou dos peixes, incorreu-se no risco de insucesso e desperdício de recursos, esforços e oportunidades. A partir da criação do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA - Lei 6.938/81) e da instituição da obrigatoriedade do Relatório de Impactos Ambientais, em 1983 - que deveria incluir levantamentos da área, descrição das ações propostas e alternativas, identificação, análise e predição dos principais impactos positivos e negativos, a decisão em relação às ações de mitigação de impactos

passou a ser prevista nesse documento (HILSDORF; PETRERE, 2002; AGOSTINHO et al., 2002).

Os estudos referentes às escadas de transposição informam sobre a eficiência na transposição de barragens, ou a capacidade de ascensão das escadas, porém, não tratam da importância e efetividade dessa transposição para a preservação dos estoques na bacia. Embora não haja dúvida quanto à habilidade de muitas espécies migradoras em ascenderem às escadas, mesmo com alturas de 20 metros ou mais e alcançarem o reservatório (BORGHETTI et al., 1994; AGOSTINHO; GOMES, 1997; AGOSTINHO et al., 2002; AGOSTINHO; GOMES, 2005), a seletividade das escadas à transposição da barragem é consenso nos estudos realizados. Alguns indicadores mostram que essas obras teriam eficiência duvidosa na preservação ou conservação dos estoques em um cenário de barragens em série, como o da bacia do rio Paraná.

De acordo com Agostinho e Gomes (2005), outra questão fundamental refere-se ao recrutamento dos estoques de peixes à jusante, pois, mesmo que escadas ou elevadores possibilitem a transposição da barragem pelos reprodutores de várias espécies de peixes, parece pouco provável que a prole fará o movimento oposto. Embora faltem dados precisos sobre esse assunto, é esperado que as escadas subtraiam do estoque a jusante um grande número de reprodutores; não promovam a reposição pelo recrutamento e tenham benefícios duvidosos quanto à manutenção dos estoques do trecho a montante, especialmente quando inexitem áreas relevantes de várzeas. Segundo Levin e Schiwe (2001), esta subtração de reprodutores no estoque a jusante, exerceria uma pressão de seleção sobre a variabilidade ou diversidade genética desse estoque, e por outro lado exerceria uma força seletiva em favos de espécies não migradoras.

Segundo Pelicice e Agostinho (2007), na América do Sul o real papel dos mecanismos de transposição para peixes (principalmente as escadas), não está claro no manejo da pesca e biodiversidade de peixes, e o resultado de alguns estudos sugerem que as escadas são problemáticas na conservação de peixes. Esses autores examinaram as características e os aspectos negativos das passagens para peixes dentro de um grande contexto e consideraram que essas facilidades são armadilhas ecológicas em algumas hidroelétricas brasileiras.

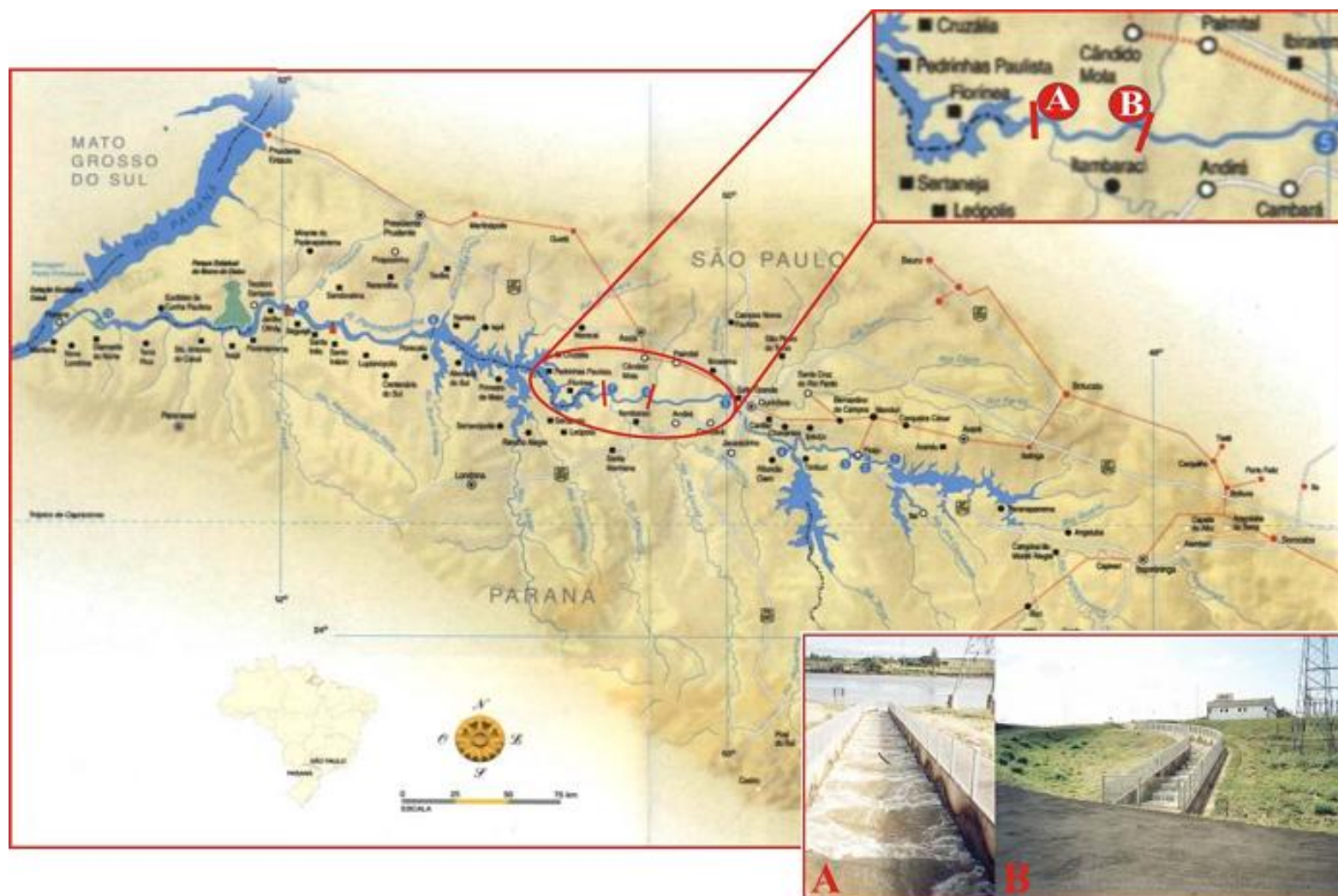
### 1.1.5 Rio Paranapanema e Complexo Canoas

O rio Paranapanema é um importante afluente da margem esquerda do rio Paraná, sendo sua nascente na vertente ocidental da Serra da Paranapiacaba, no município de Capão Bonito-SP, e está inserido na bacia do Alto Paraná. Estende-se por mais de 600 Km, com orientação leste-oeste, da nascente até sua foz com o rio Paraná nas divisas de Rosana/SP e Marilena/PR, dos quais cerca de 330 Km formam a divisa natural entre os Estados de São Paulo e Paraná. Por causa de seu desnível de aproximadamente 500m ao longo de sua extensão, este rio é amplamente explorado para geração de energia hidrelétrica (DUKE ENERGY, 2003). Atualmente são 10 usinas hidroelétricas com seus respectivos reservatórios, que começaram a ser instaladas a partir da década de 1950. O Paranapanema é considerado um rio de águas pouco poluídas (CESP, 1998). No entanto dados recentes mostram que condições mesotróficas e até mesmo eutróficas são detectadas principalmente nos reservatórios do médio curso do rio em função do uso intensivo do solo para fins agrícolas na região (NOGUEIRA et al., 2005).

Na bacia do rio Paranapanema há um regime sazonal de precipitações com a concentração das chuvas no período de verão, quando os valores mensais podem atingir cerca de 300 mm. Os reservatórios do rio Paranapanema, considerados de ambiente semilótico, apresentam grandes diferenças entre si quanto ao tamanho, tanto em termos de área como de volume, bem como quanto à relação perímetro/área (NOGUEIRA et al., 2005).

É neste contexto que em seu curso médio está situado o Complexo Canoas (Figura 1), um sistema de duas usinas hidroelétricas (UHE Canoas I e UHE Canoas II) inauguradas em 1999 e construídas pelo Consórcio Canoas, formado pela CESP – Companhia Energética de São Paulo, cujas usinas do rio Paranapanema compuseram a Companhia de Geração de Energia Elétrica Paranapanema, e pela CBA – Companhia Brasileira de Alumínio (DIAS, 2003). A jusante da UHE Canoas I encontra-se a foz do rio das Cinzas com o rio Paranapanema e compõe a porção inicial do reservatório de Capivara, caracterizada por um ambiente lótico, com profundidades de até seis metros (HOFFMAN, 2003). A montante encontra-se o reservatório da UHE Canoas I, localizado entre os municípios de Cândido Mota (SP) e Itambaracá (PR), com águas lênticas, área de 30, 85 Km<sup>2</sup>, suas margens compostas principalmente por pastagens e remanescentes de vegetação ciliar, apresentando ausência de lagoas marginais. Já o reservatório da UHE Canoas II está localizado a montante do reservatório de Canoas I, entre os municípios de Palmital (SP) e Andirá (PR), com águas

lênticas, possui área de 22,5 Km<sup>2</sup>, suas margens também são ocupadas por pastagens, com escassos remanescentes de vegetação ciliar e ausências de lagoa marginais (DIAS, 2003; DUKE ENERGY, 2003)



**Figura 1** – Mapa mostrando a drenagem do rio Paranapanema, da nascente a foz, destacando o Complexo Canoas em sua porção média. A = UHE Canoas I e B = UHE Canoas II.

Atendendo as disposições legais, foram construídas escadas para transposição de peixes nas duas usinas hidrelétricas do Complexo Canoas que foram abertas pela primeira vez em novembro de 2000. Impostas como medida mitigadora, a implantação das escadas visava garantir a migração dos peixes ao longo do médio Paranapanema, entre os reservatórios de Capivara (a jusante) e Salto Grande (a montante), na hipótese de garantir condições favoráveis à manutenção das populações de espécies migradoras nesse trecho da bacia (BRITTO; SIROL, 2005).

Segundo Britto e Sirol (2005) o monitoramento realizado nos anos subsequentes a implementação dessas escadas de transposição demonstraram também que as escadas não funcionaram efetivamente como mecanismos para descida dos peixes, não favorecendo os fenômenos de “rodada” rio abaixo (*sensu* GODOY, 1975), na mesma proporção da migração ascendente. Hipotetiza-se que essa constatação decorra provavelmente da amortização do fluxo hidráulico descendente, normalmente observado em rios livres. Mesmo que as escadas ou elevadores possibilitem a transposição da barragem pelos reprodutores de várias espécies de peixes, parece pouco provável que a prole fará o movimento oposto.

#### **1.1.6 Considerações sobre *Leporinus Friderici***

Pertencente à ordem Characiformes, família Anostomidae, subfamília Anostominae, *Leporinus friderici* (BLOCH, 1794) (Figura 2), comumente conhecido como aracu, piava ou piau três pintas, é um peixe migrador e apresenta uma ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo no Suriname, Bacia Amazônica, rios do Nordeste, bacias do rio Paraná, Paraguai e da Prata (GODOY, 1987).



**Figura 2** – Exemplar de *Leporinus friderici*, capturado no Complexo Canoas – rio Paranapanema.

A ordem Characiformes, juntamente com a de Siluriformes, representam mais de 85% da ictiofauna dos rios Neotropicais, havendo leve predomínio dos Characiformes (LOWE- McCONNELL, 1987). De acordo com Nelson (1994), esta ordem é representada por 10 famílias, 237 gêneros e 1343 espécies, sendo que a família Anostomidae compreende 12 gêneros e cerca de 140 espécies já descritas (GARAVELLO; BRITSKI, 2003).

Os anostomídeos podem ser de pequeno, médio ou grande porte, tendo grande importância para a pesca comercial e esportiva, além de serem espécies potenciais para o desenvolvimento da piscicultura (DUKE ENERGY, 2003).

Goulding (1980) relata que os peixes desta família têm hábitos alimentares generalistas e o tipo de alimento ingerido depende da disponibilidade destes no habitat. Esta estratégia alimentar favorece espécies amplamente distribuídas, pois permite a ocupação de habitats ecologicamente distintos (LOWE-McCONNELL, 1999). Embora os peixes da família Anostomidae demonstrem alta plasticidade alimentar e ampla distribuição, a estreita relação entre seu alimento e as regiões marginais dos ambientes aquáticos pode estar colocando em risco o futuro deste grupo.

As espécies do gênero *Leporinus* (piaus, piavas e piaparas), são muito importantes na bacia do rio Paranapanema, seja para a pesca artesanal ou para a piscicultura (DUKE ENERGY, 2003).

Como características morfológicas principais descritas por vários pesquisadores, *Leporinus friderici* possui corpo alongado, fusiforme, apresentando três

máculas escuras de forma arredondada e ovalada sobre o corpo, ao nível da linha lateral (GARAVELLO, 1979). É de médio porte e vive em meio a rochas e vegetação submersa. Trata-se de uma espécie onívora, porém se alimenta preferencialmente de sementes ao longo do ano. Além disso, Garavello (1979) observou que *L. friderici* partilha outros recursos, já que as populações analisadas se distribuem preferencialmente na porção inferior da coluna d'água e têm atividades noturnas. Segundo Godoy (1975), essa espécie realiza grandes migrações para a desova, onde a migração reprodutiva tem início aproximadamente no mês de setembro subindo até a parte mais alta do rio, para desovar no período de dezembro a janeiro, sendo a migração ascendente reprodutiva e a descendente trófica. Uma característica peculiar apontada por este autor é que, os machos desta espécie atingem maturidade sexual a partir do segundo ano de vida enquanto que as fêmeas somente se reproduzem a partir do terceiro ano. O tamanho no qual os indivíduos de *L. friderici* começam a sua atividade reprodutiva nos reservatórios varia de ano para ano, porém, costumam manter uma similaridade para ambos os sexos (GODOY, 1975).

Estudos a respeito da relação de fecundidade e comprimento em *L. friderici*, como na maioria das espécies de peixes, mostram que o aumento da taxa de crescimento é traduzido em uma maior produção de ovos, desde que a fecundidade aumente com o tamanho do corpo do animal. O período de postura pode ser marcado por um aumento da fecundidade das espécies, ocorrendo preferencialmente para *L. friderici* no período de primavera e verão, tendo uma desova total e desenvolvimento assincrônico acumulativo (ORSI, 2005). Os lugares escolhidos para desova para *L. friderici* são similares nos reservatórios, correspondendo ao ambiente mais lótico (BRUSCHI, 2005).

## 2 OBJETIVOS

As atividades de manejo dos recursos aquáticos nos reservatórios brasileiros são ocasionais e, em geral, carentes de fundamentação técnica–científica. São exercidos basicamente através do controle da pesca e do repovoamento, ambos com eficácia reduzida. Além dessas ações, outras mais foram implementadas, como a construção de facilidades para transposição de peixes pelas barragens (escadas para transposição de peixes), visando mitigar os impactos desses obstáculos à migração dos peixes.

O objetivo geral do presente estudo é de averiguar a variabilidade e a estrutura genética de grupos de *Leporinus friderici* que migram através das escadas para transposição de peixes do Complexo Canoas - rio Paranapanema em diferentes piracemas, através da utilização de marcadores moleculares de RAPD e microssatélites.

Os objetivos específicos são:

1. Quantificar a variabilidade genética dos grupos de *L. friderici* capturados nas escadas de transposição (Canoas I e II) durante a piracema dos anos de 2003, 2004 e 2005.
2. Estimar parâmetros de diversidade genética para os grupos de *L. friderici* coletados na escada para transposição de peixes da UHE de Canoas I durante as diferentes piracemas, bem como entre os da escada de transposição de Canoas II, para verificar a possível existência de cardumes com estrutura genética diferente.
3. Realizar análise comparativa, através de diferentes parâmetros de diversidade genética, entre os grupos coletados na escada de transposição de Canoas I com aqueles provenientes de Canoas II, com a finalidade de observar se os grupos amostrados pertencem a uma única população ou se são oriundos de populações geneticamente diferenciadas.

A obtenção desses dados sobre a estrutura populacional de *L. friderici* será importante para o desenvolvimento de programas de manejo, aquicultura e conservação dos estoques naturais dessa espécie nessa região do rio Paranapanema.

## Artigo

**ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE *Leporinus friderici* (CHARACIFORMES,  
ANOSTOMIDAE) DAS ESCADAS PARA TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES DO  
COMPLEXO CANOAS – RIO PARANAPANEMA.**

Trabalho a ser submetido ao periódico **Genetics and Molecular Biology**

**Artigo****ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE *Leporinus friderici* (CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE) DAS ESCADAS PARA TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES DO COMPLEXO CANOAS – RIO PARANAPANEMA.**

Fernando Yuldi Ashikaga<sup>1</sup>, Fernanda Simões de Almeida<sup>1</sup>, Mário Luís Orsi<sup>2</sup>, Sandro Geraldo de Castro Britto<sup>3</sup>, Leda Maria Koelblinger Sodré<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

<sup>3</sup> Duke Energy International – Geração Paranapanema, Xavantes, São Paulo, Brasil

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

Caixa Postal, 6001 – CEP 86051-990

Londrina (PR) – Brasil Telefone 55-43-3371-4437 e-mail: leda @uel.br

**Running title** – Estrutura genética de *L. friderici*

**Palavras chave:** escada para transposição de peixes, estrutura populacional, RAPD, microsatélite.

\* autor para correspondência

## RESUMO

As barragens construídas ao longo de sistemas hídricos interrompem a dispersão e a migração dos organismos aquáticos, afetando principalmente a abundância das espécies de peixes migradores. Mecanismos para transposição foram construídos em barragens visando minimizar esses impactos. Poucas são as informações disponíveis sobre o efeito da construção de barragens na estrutura genética populacional da fauna Neotropical de peixes migradores. A conservação da diversidade genética é de fundamental importância para sobrevivência de uma espécie a longo tempo, pois a manutenção de um *pool* gênico com variabilidade suficiente faz-se necessário para a adaptação da espécie a alterações ambientais. Nesse contexto, marcadores moleculares RAPD e microssatélites, foram utilizados para avaliar a diversidade e estrutura genética da espécie migradora *Leporinus friderici* no Complexo Canoas – rio Paranapanema – Brasil. Sete grupos foram amostrados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II durante o período reprodutivo em três anos consecutivos. Ambos os marcadores evidenciaram uma alta diversidade genética para esses grupos. Os marcadores microssatélites mostraram uma perda de heterozigosidade e uma considerável taxa de endocruzamento para a espécie. A diferenciação genética encontrada entre os grupos, com ambos os marcadores utilizados, pode ser considerada de baixa a moderada. Os dados obtidos com os parâmetros de diversidade genética (distância e identidade genética,  $F_{ST}$  e AMOVA) permitiram concluir que os grupos de *L. friderici* do Complexo Canoas estão estruturados como uma única população. Os dados obtidos sobre a diversidade genética e estrutura populacional de *L. friderici* são de grande importância para o desenvolvimento de programas de manejo e conservação da espécie no Complexo Canoas, podendo também ser utilizados em programas de aquicultura.

## Introdução

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

Essa diversidade contém um número elevado de estoques naturais, os quais vêm sofrendo sensíveis reduções nos cursos d'água, como resultado da exploração desordenada dos recursos, pela captura de indivíduos jovens, pela pesca predatória, falta de fiscalização e medidas protecionistas e, principalmente, pela crescente fragmentação dos rios devido à construção de empreendimentos hidrelétricos, que modificam as áreas de desova coletivas e interrompem o trajeto de algumas espécies. Desta maneira, torna-se fundamental o conhecimento da biologia e da dinâmica populacional destes animais para a tomada de medidas racionais na preservação dos estoques (AGOSTINHO et al., 2002; HILSDORF; PETRERE, 2002; CAROLSFELD et al., 2003).

A legislação ambiental vigente no país exige do empreendedor responsável pela barragem a proposição de um programa de conservação de organismos aquáticos de modo a minimizar o impacto destes represamentos (CESP, 2000). De acordo com Agostinho et al. (1992), em função das leis implementadas no país, escadas para transposição de peixes tem sido construídas em barragens com a finalidade de facilitar as rotas migratórias e a manutenção dos estoques naturais da ictiofauna. Vários estudos mostram que as espécies de peixes migradoras utilizam as escadas para transposição da barragem e atingem o reservatório, no entanto, existem dúvidas na eficiência desse mecanismo na preservação ou

conservação dos estoques em um cenário de hidroelétricas em série (AGOSTINHO et al., 2002; AGOSTINHO; GOMES, 2005).

O rio Paranapanema, um importante afluente da bacia do rio Paraná, nos últimos 50 anos tem sofrido forte intervenção humana com a construção de 10 usinas hidroelétricas formando um sistema de reservatórios em cascata. O Complexo Canoas, localizado no médio rio Paranapanema, situado a montante do reservatório Capivara (UHE Escola Engenharia Mackenzie) e a jusante do reservatório de Salto Grande (UHE Lucas Nogueira Garcez), foi construído em 1999 e é constituído por duas usinas hidroelétricas com seus respectivos reservatórios, UHE de Canoas I e de Canoas II, as quais foram as únicas a receber escadas para transposição de peixes que começaram a operar em novembro de 2000 (DUKE ENERGY 2003; BRITTO; SIROL 2005).

Pertencente à ordem Characiformes, família Anostomidae, subfamília Anostominae, *Leporinus friderici* (BLOCH, 1974), comumente conhecido como aracu, piava ou piau três pintas, é um peixe migrador e apresenta uma ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo no Suriname, bacia Amazônica, rios do Nordeste, bacias do rio Paraná, Paraguai e do Prata (GODOY, 1987). Esta espécie assim como outras do gênero *Leporinus* (piaus, piavas e piaparas), são muito importantes na bacia do rio Paranapanema, seja para a pesca comercial, artesanal ou para a piscicultura (DUKE ENERGY, 2003). Segundo Godoy (1975) *L. friderici* realiza grandes migrações para a desova, onde a migração reprodutiva tem início aproximadamente no mês de setembro subindo até a parte mais alta do rio, para desovar no período de dezembro a janeiro, sendo a migração ascendente reprodutiva e a descendente trófica. Os lugares escolhidos para desova por *L. friderici* são similares nos reservatórios, correspondendo ao ambiente mais lótico (BRUSCHI, 2005).

De acordo com Hilsdorf e Petrerre (2002), o conhecimento prévio da distribuição da diversidade genética dentro e entre populações de uma espécie, é uma etapa inicial importante

para o desenvolvimento do manejo e conservação *in situ* e de repovoamento. Para isso, deve-se levar em conta se uma espécie está distribuída como apenas uma população, ou como populações geneticamente diferentes e qual o grau de interação entre elas. No caso de peixes de água doce, suas populações em geral se distribuem por locais isolados, o que pode minimizar as trocas gênicas entre elas, o que leva a processos de diferenciação genética. Portanto, avaliações da estrutura genética de populações tornam-se necessárias, pois permitem extrair importantes informações a respeito das populações naturais e para a elaboração de planos de manejo (cf. LOPES *et al.*, 2007). Técnicas moleculares como isoenzimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites (SSR –*Simple Sequence Repeats*), entre outras, têm sido amplamente utilizadas para estudos da diversidade e estrutura genética de peixes neotropicais, não somente para fins econômicos, mas também para preservação e manutenção da biodiversidade (TORRES *et al.*, 2004; PAIVA *et al.*, 2006; AFFONSO; GALETTI, 2007).

Considerando o exposto acima, os marcadores moleculares RAPD e microssatélites foram utilizados para investigar a diversidade genética dentro e entre sete grupos de espécimes de *Leporinus friderici*, amostrados nas escadas para transposição de peixes do Complexo Canoas em diferentes períodos reprodutivos. Com os dados obtidos neste estudo, espera-se contribuir para a elaboração de projetos de manejo que visem à conservação de *L. friderici* nesta região do rio Paranapanema, visto que, compreender a diversidade genética existente, assim como sua distribuição dentro de populações de uma determinada espécie, seria um passo inicial importantíssimo na elaboração de projetos de conservação.

## Material e Métodos

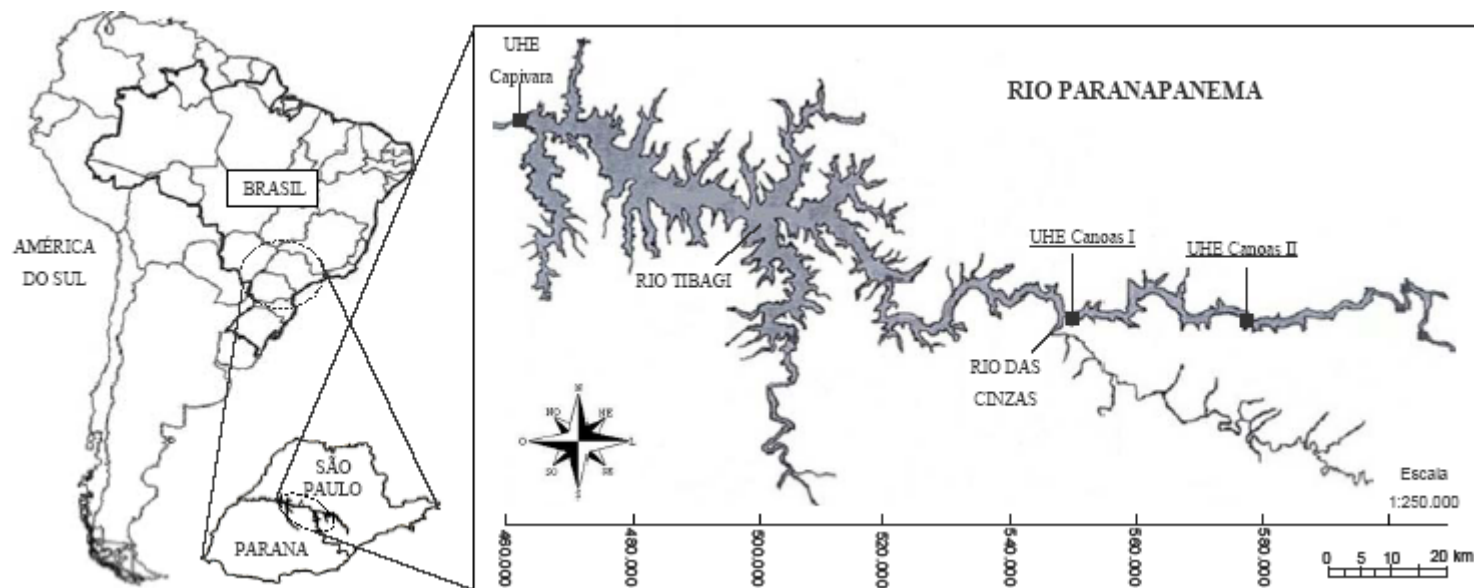
### Coleta de amostras

Os exemplares de *Leporinus friderici* (BLOCH,1794) foram capturados nas escadas para transposição de peixes das Usinas Hidroelétricas de Canoas I (50° 31'W e 22° 56') e Canoas II (50° 15'W e 22° 56'), situadas no médio rio Paranapanema (Figura 1). As coletas foram realizadas nos períodos de piracema, de setembro a março, durante os anos de 2003 a 2005, formando assim, grupos de diferentes piracemas que foram analisados comparativamente.

Para a captura dos indivíduos desta espécie foram utilizadas redes de arrasto de diferentes malhas e tarrafas. Após a captura destes exemplares, foram retiradas amostras de tecido muscular e, da maioria, a nadadeira adiposa, que foram conservadas em álcool ou mantidas em temperatura de -20°C, para posterior uso nas análises a serem realizadas. A maioria dos exemplares foi liberada no mesmo local de coleta e alguns foram catalogados e depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina. Na Tabela 1 estão relacionados os grupos coletados bem como o número de espécimes analisado para cada um dos marcadores moleculares.

**Tabela 1:** Grupos de *Leporinus friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes das UHEs de Canoas I e Canoas II e número de exemplares analisados para os marcadores de RAPD e microssatélites.

Grupos	Canoas I		Canoas II	
	microssatélites	Marcadores RAPD	microssatélites	Marcadores RAPD
Início 2003	18	12 - Grupo 2	---	---
Final 2003	22	12 - Grupo 1	22	16 - Grupo 7
Início 2004	---	---	19	16 - Grupo 5
Final 2004	---	---	---	---
Início 2005	22	24 - Grupos 3 e 4	22	16 - Grupo 6
Final 2005	22	---	---	---
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>48</b>	<b>63</b>	<b>48</b>



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

## **Extração e quantificação do DNA**

A extração do DNA seguiu o protocolo descrito por Almeida *et al.* (2001). A quantificação do DNA foi realizada utilizando um fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoefer), seguindo os procedimentos estabelecidos pelo fabricante. O DNA das amostras foi ajustado a uma concentração de 5 ng/μl para uso nas reações de amplificação.

## **Amplificação do DNA**

### ***Marcadores RAPD***

Os sete *primers* (OPA1, OPAC10, OPW2, OPW6, OPW16, OPX15, OPX18) utilizados foram selecionados, com base na qualidade e quantidade de bandas geradas, a partir de quatro *kits* (OPA, OPAC, OPW e OPX) de oligonucleotídeos da Operon Technologies.

Cada reação de amplificação continha 3,3 μl de água bidestilada; 1,5 μl de tampão de reação 10x; 1,5 μl de dNTPs (250 μM); 5 μl de MgCl<sub>2</sub> (3,3 mM); 2 μl de *primer* (0,33 μM) e 0,2 μl de Taq DNA Polimerase (1 U), somando 13,5 μl de solução, mais 1,5 μL de DNA de cada amostra (0,5 ng/μL). A amplificação das amostras de DNA foi realizada utilizando-se um termociclador (PTC-100, MJ Research) e seguiu um programa composto de uma desnaturação inicial a 92°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos, cada um contendo as seguintes fases: 40 segundos a 92°C (desnaturação), 1 minuto e 30 segundos a 40°C (pareamento) e 2 minutos a 72°C (extensão), com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

### ***Marcadores microssatélites***

Morelli *et al.* (2007) isolaram e caracterizaram oito locos de microssatélites para a espécie *Leporinus macrocephalus*, para os quais foram construídos pares de *primers* (Lmac 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08 e 09) e que testados tiveram resultados satisfatórios para a

amplificação desses locos em *Leporinus friderici*. Para a seleção dos pares de *primers* a serem utilizados no presente trabalho, foram realizadas otimizações em todo o processo de amplificação de DNA com os oito pares de *primers* acima citados, em *L. friderici* coletados no Complexo Canoas, sendo selecionados aqueles para os locos Lmac 02, Lmac 05, Lmac 06 e Lmac 07.

Cada reação de amplificação continha 9,45 µl de água bidestilada; 2,5 µl de Tampão 10x; 1,6 µl de dNTPs (200 µM); 3,75 µl de MgCl<sub>2</sub> (1,87 mM); 0,5 µl de cada *primer* (*Forward* = F e *Reverse* =R) (200 µM) e 0,2 µl de Taq DNA Polimerase (1 U), somando 18,5 µl de solução, mais 1,5 µL de DNA de cada amostra. A amplificação das amostras de DNA foi realizada utilizando-se um termociclador (PTC-100, MJ Research) e utilizando um programa composto de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos, cada um contendo as seguintes fases: 15 segundos a 92°C (desnaturação), 15 segundos a 56°C (anelamento) e 15 segundos a 72°C (extensão), com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na Tabela 2 são apresentados os pares de *primers* utilizados por loco, bem como as seqüências de repetição desses locos.

**Tabela 2:** Seqüência de nucleotídeos das repetições *motifs* e dos *primers* flanqueadores para os locos de microsatélite analisados para *Leporinus friderici* das escadas de transposição para peixes do Complexo Canoas.

Locos	Repetição <i>motif</i>	Seqüência dos <i>Primers</i> (5'→3')
Lmac 02	(TG) <sub>23</sub> (AG) <sub>10</sub>	F:ACTTCCCTCCCTAATCTGTG R:AGGGTGTAAGATGTATGAAG
Lmac 05	(CT) <sub>14</sub>	F:CGTGTGCTTCTGTTTGTGTG R:GGCTGAAGTATGAGAGGTAAG
Lmac 06	(CA) <sub>17</sub>	F:CTCTACTTCACTTTTACAGCAG R:CCCGAGCCGCGTCACACTTC
Lmac 07	(TC) <sub>17</sub>	F:GTGGGAACATTTGGGATTAT R:CAGAAGAGAGGGCGAGAGGG

## **Análise Eletroforética**

### ***Marcadores RAPD***

Ao DNA amplificado foi acrescentado tampão de amostra (Ficoll e azul de bromofenol) e submetido ao processo eletroforético em géis de agarose 1,4% preparados com tampão TEB 0,5x, diluído da solução 10x (Tris 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M e EDTA 0,01M pH 8,3), em cubas apropriadas contendo o mesmo tampão. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de 100 bp (Amersham Biosciences). Foi mantido entre os eletrodos 3V/cm e a migração do material estendeu-se por mais ou menos 10 cm do gel (4 horas, aproximadamente). Os géis então foram corados com brometo de etídio (5 µL/mL) e fotografados em transiluminador ultravioleta no sistema de foto-documentação digital Kodak EDAS 290. A partir dessas fotos foram analisados os perfis eletroforéticos de RAPD para a obtenção dos dados necessários as análises genéticas.

### ***Marcadores microssatélites***

Da mesma forma para os marcadores microssatélites, foi adicionado tampão de amostra (Ficoll e azul de bromofenol) ao DNA amplificado, sendo este então submetido ao processo eletroforético. A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 8% (13,5 mL de água destilada; 4 mL de poliacrilamida 40% [38 g de acrilamida; 2 g de bis-acrilamida; água ultra-pura até completar o volume de 100 mL]; 2 mL de TEB 10x; 500 µL de persulfato de potássio [1 g de persulfato de potássio; 9 mL de água destilada]; 26 µL de TEMED) em cubas apropriadas com tampão TEB 1,0x. O DNA de 10 bp (Invitrogen) foi utilizado como marcador de peso molecular. Foi mantido entre os eletrodos em torno de 21 V/cm e a migração eletroforética estendeu-se por mais ou menos 2 horas. Os géis então foram corados com nitrato de prata (2 g/10 ml) e fotografados no sistema de foto-documentação digital Kodak EDAS 290.

## **Análise Genética**

As análises genéticas dos resultados obtidos com ambos os marcadores utilizados foi realizada em dois momentos: (1) estimativa de parâmetros genéticos em nível intra-populacional (avaliação do índice de variabilidade existente dentro de cada grupo amostrado) e (2) estimativa de parâmetros diversidade genética em nível inter-populacional (diversidade e estrutura genética).

Para a realização das análises genéticas intra-populacionais, foram considerados os grupos de *L. friderici* conforme Tabela 1.

Quando realizadas as análises genéticas inter-populacionais, foram realizados dois tipos de análise: 1) análise inter-populacional I, onde os quatro grupos de *L. friderici* de Canoas I foram comparados entre si, o mesmo ocorrendo para os grupos de Canoas II; 2) análise inter-populacional II onde os espécimes coletados nas escadas para transposição do Complexo Canoas foram considerados como uma única população composta por sete subpopulações (grupos).

### ***Marcadores RAPD***

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

Na análise intrapopulacional, a variabilidade genética dos diferentes grupos de *L. friderici* foi estimada pela proporção dos sítios polimórficos (Ps) e diversidade gênica para

todos os locos ( $\pi_n$ ) através do software ARLEQUIN 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005).

Para análise inter-populacional o software TFPGA 1.3 (MILLER, 1997) foi utilizado para o cálculo da distância (D) e identidade (I) genética não tendenciosa de Nei (1978).

Ainda para a análise inter-populacional, o software ARLEQUIN 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005) foi utilizado para a realização da AMOVA (Análise de Variância Molecular), a qual forneceu estimativas dos componentes de variância e estatísticas análogas as  $F$  de Wright (1951). A significância dos componentes de variância e estatísticas- $F$  foi testada usando métodos de permutação, eliminando a hipótese de normalidade que é convencional para análises de variância, mas inapropriado para dados moleculares (EXCOFFIER et al., 1992).

Wright (1978) sugeriu que os valores de  $F_{ST}$  podem ser interpretados qualitativamente em termos de diferenciação genética como: valores de 0 a 0,05 indicam baixa diferenciação genética; 0,05 a 0,15 moderada; 0,15 a 0,25 alta e acima de 0,25 diferenciação genética muito alta. Essa escala foi adotada como referência na interpretação dos valores de  $F_{ST}$  obtidos no presente estudo.

### ***Marcadores microssatélites***

A partir do software ARLEQUIN 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005), considerando o primeiro nível de análise proposto (análise inter-populacional I), foram utilizados os seguintes índices de diversidade molecular: heterozigosidade observada e esperada; e testado o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco em cada grupo através do “Teste Exato usando uma cadeia de Markov” (GUO; THOMPSON, 1992).

O mesmo software citado acima foi utilizado para realizar o teste AMOVA, dentro dos dois níveis de análise (análise inter-populacional I e II). Esse teste foi capaz de fornecer estimativas dos componentes de variância e estatísticas análogas as  $F$  de Wright (1951). Foi obtido também o  $F_{ST}$  por par de grupos (análise inter-populacional I) amostrados através do método de distância por número de alelos diferentes.

## Resultados

### Marcadores RAPD

Nas análises de *L. friderici* com os marcadores de RAPD, foram utilizados quatro grupos (1, 2, 3 e 4) com 12 espécimes cada um coletados na escada de transposição de Canoas I e três (5, 6 e 7) com 16 espécimes cada, provenientes de Canoas II, conforme apresentado na Tabela 1. Os sete *primers* utilizados produziram um total de 137 locos, sendo que o número de fragmentos produzidos por *primer* variou de 16 a 24.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de variabilidade genética, estimados pela proporção de sítios polimórficos ( $P_s$ ) onde pode ser observado que os diferentes grupos apresentaram valores de  $P_s$  superiores a 40%, e de diversidade gênica média para todos os locos ( $\pi_n$ ) com valores superiores a 0,184.

**Tabela 3:** Diversidade genética intra-populacional utilizando marcadores RAPD para os grupos de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

GRUPOS	$P_s$	$\pi_n$
1- CI – INÍCIO 2003	0,403	0,187
2- CI - FINAL 2003	0,418	0,196
3- CI – INÍCIO 2005	0,440	0,194
4- CI – FINAL 2005	0,418	0,187
5- CII – FINAL 2003	0,455	0,189
6- CII – INÍCIO 2004	0,448	0,192
7- CII – INÍCIO 2005	0,455	0,184
	$\bar{P}_s = 0,434$	

$P_s$ : proporção de sítios polimórficos;  $\bar{P}_s$ : proporção média de sítios polimórficos;  
 $\pi_n$ : diversidade gênica média para todos os locos.

Considerando a análise inter-populacional I, onde os espécimes coletados em cada uma das escadas para transposição foram considerados uma população composta por subpopulações (grupos), os valores estimados de distância e identidade genética obtidos nessa análise são apresentados na Tabela 4. Na comparação entre os grupos de *L. friderici* de Canoas I foi observado que a menor distância genética (0,0109) foi entre o grupo 3 x grupo 4, e a maior (0,0250) entre o grupo 1 x grupo 4. Entre os grupos de Canoas II estes valores foram de 0,0058 (grupo 6 x grupo 7) e 0,0083 (grupo 5 x grupo 7), respectivamente.

**Tabela 4:** Distância genética (diagonal abaixo) e identidade genética (diagonal acima) utilizando marcadores RAPD entre os grupos de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 – 4 em azul) e Canoas II (5 – 7 em vermelho) – rio Paranapanema

	1	2	3	4	5	6	7
1	****	0,9833	0,9779	0,9753	0,9584	0,9566	0,9578
2	0,0169	****	0,9826	0,9754	0,9683	0,9585	0,9607
3	0,0224	0,0176	****	0,9892	0,9595	0,9592	0,9618
4	0,0250	0,0249	0,0109	****	0,9513	0,9530	0,9563
5	0,0425	0,0323	0,0414	0,0500	****	0,9933	0,9917
6	0,0444	0,0424	0,0416	0,0482	0,0068	****	0,9942
7	0,0431	0,0401	0,0390	0,0446	0,0083	0,0058	****

A análise de variância molecular (AMOVA), para o nível de análise inter-populacional I encontra-se na Tabela 5. Os resultados obtidos indicaram tanto para *L. friderici* de Canoas I como de Canoas II, que a maior fonte de variação está dentro dos grupos amostrados para cada localidade e não entre eles. Os valores de  $F_{ST}$  foram estatisticamente significativos indicando a existência de diferenciação genética.

**Tabela 5:** Análise da variância molecular (AMOVA) e  $F_{ST}$ , utilizando marcadores RAPD entre os grupos de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHEs de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

População	Fonte de variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	$F_{ST}$
Canoas I	Entre os grupos	3	61,229	0,63342	4,71	0,047*
	Dentro de grupos	44	563,583	12,80871	95,29	
	Total	47	624,812			
Canoas II	Entre os grupos	2	34,167	0,27995	2,17	0,022*
	Dentro de grupos	47	567,188	12,60417	97,83	
	Total	47	601,354			

\* valores significativos a 5% de probabilidade com 1000 permutações. g.l. = graus de liberdade

$F_{ST}$  = Índice de Fixação de Alelos

Para a análise inter-populacional II, onde os espécimes coletados nas escadas para transposição do Complexo Canoas foram considerados como uma única população composta por sete subpopulações (grupos), os valores de distância genética (Tabela 4) foram menores nas comparações entre os grupos de Canoas I e aqueles de Canoas II, do que nas comparações entre os grupos de Canoas I e os grupos de Canoas II, sendo também concordantes com os

dados de identidade genética (valores destacados em verde na tabela).

Na Tabela 6 são apresentados os dados estimados da AMOVA, que mostram também que a maior fonte de variação (90,97%) está dentro dos grupos e não entre estes. O valor de  $F_{ST}$  (0,090) estimado é estatisticamente significativo.

**Tabela 6:** Análise da variância molecular (AMOVA) e  $F_{ST}$ , utilizando marcadores RAPD para a população de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHEs de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

População	Fonte de variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	$F_{ST}$
	Entre os grupos	6	179,667	1,26140	9,03	0,090*
Complexo Canoas	Dentro de grupos	89	1130,771	12,70529	90,97	
	total	95	1310,438	13,96669		

\* valores significativos a 5% de probabilidade com 1000 permutações. g.l. = graus de liberdade

$F_{ST}$  = Índice de Fixação de Alelos

Os valores de  $F_{ST}$  par a par, apresentados na Tabela 7, são maiores e estatisticamente significativos quando são comparados os grupos de Canoas I com os de Canoas II.

**Tabela 7:**  $F_{ST}$  par a par, obtidos utilizando marcadores RAPD, entre os grupos de *Leporinus friderici* das escadas de transposição para peixes das UHEs Canoas I (1 – 4) e Canoas II (5 – 7) – rio Paranapanema.

	1	2	3	4	5	6	7
1	0,00000						
2	0,06999*	0,00000					
3	0,06577*	0,02654	0,00000				
4	0,05032*	0,05931*	0,00800	0,00000			
5	0,13267*	0,10771*	0,11729*	0,12961*	0,00000		
6	0,15603*	0,13815*	0,10913*	0,11861*	0,02075	0,00000	
7	0,13672*	0,14131*	0,11151*	0,10605*	0,03520*	0,00898	0,00000

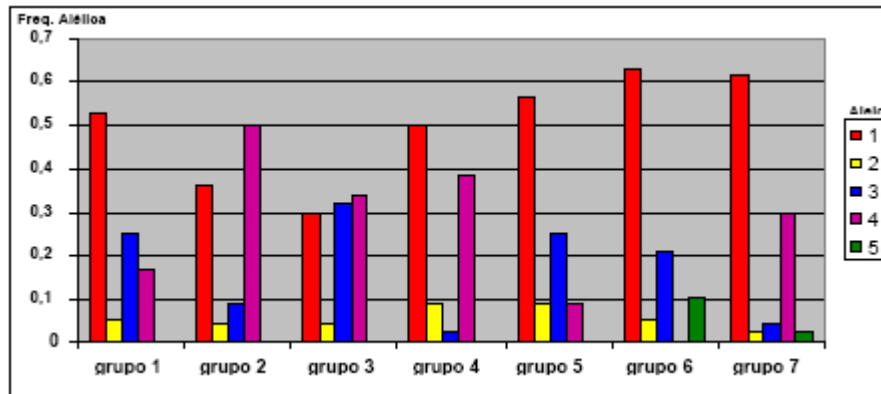
\* valor estatisticamente significativo ao nível de 5%.

### *Marcadores Microsatélites*

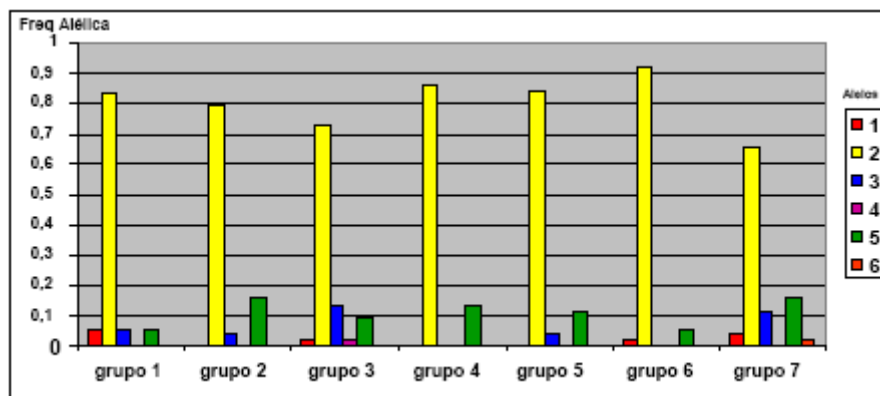
Nas análises de *L. friderici* com os marcadores de microsatélites, foram utilizados quatro grupos para CI e três para CII conforme a Tabela 1. Para os quatro locos de

microsatélites analisados, Lmac 2, Lmac 5, Lmac 6 e Lmac 7, foram obtidos, respectivamente, cinco, seis, cinco e quatro alelos.

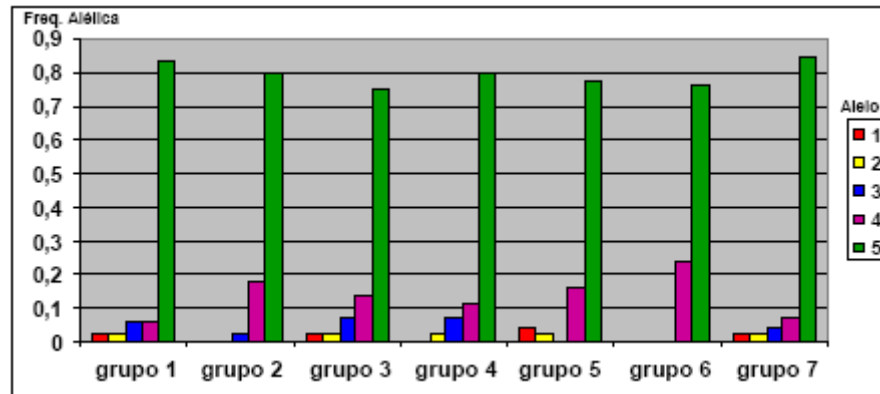
Nas Figuras 2, 3, 4 e 5 são apresentadas as distribuições das frequências dos alelos de cada loco analisado para cada grupo de *L. friderici* amostrado.



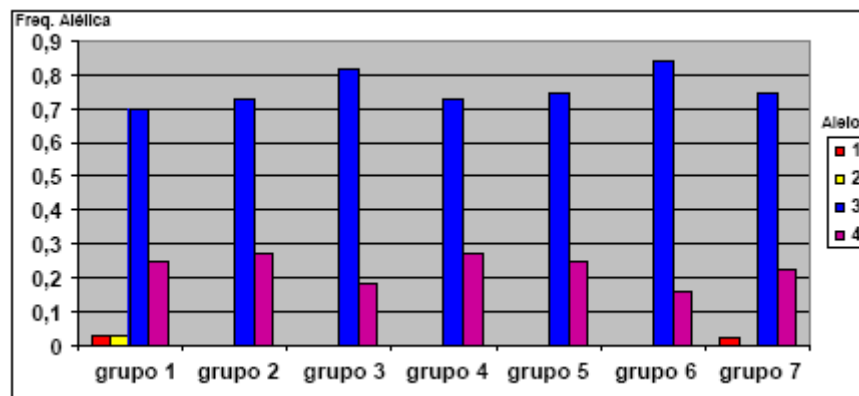
**Figura 2:** Frequências alélicas para o loco Lmac02 para os grupos de *Leporinus friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II- rio Paranapanema.



**Figura 3:** Frequências alélicas para o loco Lmac05 para os grupos de *Leporinus friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II- rio Paranapanema.



**Figura 4:** Frequências alélicas para o loco Lmac06 para os grupos de *Leporinus friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II- rio Paranapanema.



**Figura 5:** Frequências alélicas para o loco Lmac07 para os grupos de *Leporinus friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II- rio Paranapanema.

Na Tabela 8 estão apresentados os valores de heterozigosidade observada e esperada intraloco nos diferentes grupos de *L. friderici* analisados, bem como a probabilidade do teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos diferentes grupos. Notamos que os valores de heterozigosidade observada são menores do que os esperados, na maioria dos grupos, e considerando os valores de significância ao nível de 5%, constatamos que na maioria dos grupos a distribuição das frequências dos alelos dos locos encontra-se dentro do esperado pelo equilíbrio genético.

**Tabela 8:** Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) intraloco e probabilidade para o Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (PHW) para os quatro locos microssatélite nos grupos de *Leporinus friderici* das escadas de transposição para peixes das UHEs Canoas I (1 - 4) e Canoas II (5 - 7) – rio Paranapanema.

	1- CI – INÍCIO 2003			5- CII – FINAL 2003		
Locos	$H_o$	$H_e$	PHW	$H_o$	$H_e$	PHW
Lmac06	0,22222	0,35238	0,02569*	0,45455	0,41860	1,00000
Lmac07	0,44444	0,46667	0,04374*	0,40909	0,38372	1,00000
Lmac02	0,83333	0,64762	0,00201*	0,72727	0,61205	0,17977
Lmac05	0,33333	0,35079	1,00000	0,04545	0,32347	0,00031*
	2- CI – FINAL 2003			6- CII - INÍCIO 2004		
	$H_o$	$H_e$	PHW	$H_o$	$H_e$	PHW
Lmac06	0,31818	0,40381	0,22506	0,36842	0,41110	1,00000
Lmac07	0,31818	0,45772	0,30779	0,31579	0,27312	1,00000
Lmac02	0,54545	0,62156	0,33148	0,68421	0,59033	0,55180
Lmac05	0,40909	0,34778	1,00000	0,15789	0,24467	0,15975
	3- CI – INÍCIO 2005			7- CII INÍCIO 2005		
	$H_o$	$H_e$	PHW	$H_o$	$H_e$	PHW
Lmac06	0,31818	0,42495	0,23791	0,22727	0,33087	0,10585
Lmac07	0,18182	0,34884	0,10526	0,45455	0,45032	1,00000
Lmac02	0,54545	0,70930	0,01688*	0,59091	0,57294	0,92254
Lmac05	0,31818	0,49154	0,02260*	0,50000	0,53700	0,13881
	4- CI – FINAL 2005					
	$H_o$	$H_e$	PHW			
Lmac06	0,40909	0,35729	1,00000			
Lmac07	0,36364	0,45032	0,62081			
Lmac02	0,50000	0,60571	0,14491			
Lmac05	0,27273	0,28013	1,00000			

\* valor estatisticamente significante ao nível de 5%.

As estimativas de diversidade genética intrapopulacional podem ser observadas na Tabela 9, onde o número médio de alelos variou de 3,00 a 4,50; heterozigosidade média observada de 0,341 a 0,458; heterozigosidade média esperada de 0,379 a 0,493 e diversidade gênica para todos os locos superior a 0,349.

**Tabela 9:** Índices de diversidade genética intrapopulacional obtidos com marcadores microssatélites para os grupos de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

GRUPOS	$N_a$	$\bar{H}_o$	$\bar{H}_e$	$\pi_n$	$F_{IS}$
1- CI – INÍCIO 2003	4,25	0,45833	0,45436	0,43095	-0,06553
2- CI - FINAL 2003	3,00	0,39773	0,45771	0,44107	0,10037
3- CI – INÍCIO 2005	4,00	0,34091	0,49365	0,47252	0,28328
4- CI – FINAL 2005	3,00	0,38636	0,42336	0,40248	0,04097
5- CII – FINAL 2003	3,25	0,40909	0,43446	0,41596	0,01691
6- CII – INÍCIO 2004	2,75	0,38158	0,37980	0,34993	-0,09319
7- CII – INÍCIO 2005	4,5	0,44318	0,47278	0,44794	0,01087
		<b>H=0,40245</b>	<b>h = 0,44516</b>		<b>0,055</b>

$N_a$ : número médio de alelos por loco;  $H_o$ : heterozigosidade média observada;  $H_e$ : heterozigosidade média esperada;  $H$ : heterozigosidade média total observada;  $h$ : heterozigosidade média total esperada;  $\pi_n$ : diversidade genética para todos os locos;  $F_{IS}$ = Índice de Fixação Intrapopulacional.

A análise de variância molecular (AMOVA), para o nível de análise interpopulacional I encontra-se na Tabela 10. Os resultados obtidos indicaram, tanto para *L. friderici* de Canoas I como de Canoas II, que a maior fonte de variação está dentro dos grupos amostrados para cada localidade e não entre eles. Os valores de  $F_{ST}$  foram estatisticamente significativos indicando a existência de diferenciação genética entre os grupos. Considerando a análise interpopulacional I onde os espécimes coletados em cada uma das escadas para transposição foram considerados uma população composta por subpopulações (grupos), a análise da AMOVA (Tabela 10) revela que a maior fonte de variação está presente entre os indivíduos (91,53%) que é menor dentro dos grupos (6,64%) e entre os grupos (1,83%). Os valores estimados de  $F_{ST}$  (0,01834) e  $F_{IS}$  (0,06762) para esta análise mostram uma baixa tendência a diferenciação dos grupos o que corrobora com a afirmativa de que a maior fonte de variação encontra-se entre os indivíduos.

**Tabela 10:** Análise da variância molecular (AMOVA),  $F_{ST}$  e  $F_{IS}$ , utilizando marcadores microsatélite entre os grupos de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHEs de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

População	Fonte de variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	$F_{ST}$	$F_{IS}$
Canoas I	Entre os grupos	3	4,485	0,01260	1,42		
	Entre indivíduos dentro dos grupos	80	77,348	0,09057	10,19	0,014	0,104*
	Dentro de indivíduos	84	66,000	0,78571	88,39		
	Total	167	147,833				
Canoas II	Entre os grupos	2	2,746	0,01360	1,64		
	Entre indivíduos dentro dos grupos	60	48,190	-0,01111	1,34	0,016	-0,014
	Dentro de indivíduos	63	52,000	0,82540	99,70		
	Total	125	102,937				
CIxCII	Entre os grupos	1	3,236	0,01609	1,83		
	Entre indivíduos dentro dos grupos	145	133,278	0,05822	6,64	0,018*	0,068*
	Dentro de indivíduos	147	118,000	0,80272	91,53		
	Total	293	254,514				

\* valores significativos a 5% de probabilidade com 1000 permutações. g.l. = graus de liberdade. CI = Canoas I, CII = Canoas II;  $F_{ST}$  = Índice de Fixação de Alelos;  $F_{IS}$  = Índice de Fixação Intrapopulacional.

No segundo nível de análise inter-populacional (análise inter-populacional II), onde os sete grupos foram considerados subpopulações de uma única população, os valores de  $F_{ST}$  par a par (Tabela 11) variaram de 0,0000 a 0,09307. Vale ressaltar que valores de estatística  $F$  negativos, segundo Excoffier et al. (1992), devem ser considerados como nulos, portanto zero.

**Tabela 11:**  $F_{ST}$  par a par, obtidos com marcadores microsatélites, entre os grupos de *Leporinus friderici* das escadas de transposição para peixes das UHEs Canoas I (1 – 4) e Canoas II (5 – 7) – rio Paranapanema.

	1	2	3	4	5	6	7
1	0,00000						
2	0,03398*	0,00000					
3	0,01444	0,01383	0,00000				
4	0,01207	-0,00561	0,03145*	0,00000			
5	-0,01431	0,04780*	0,02765*	0,02462*	0,00000		
6	0,01564	0,09307*	0,06592*	0,05995*	-0,00544	0,00000	
7	0,00726	0,02209	0,03493*	0,00398	0,02020	0,05268*	0,00000

\* valor estatisticamente significante ao nível de 5%.

A AMOVA para este segundo nível de análise foi realizada e seus resultados são apresentados na Tabela 12. Novamente a maior fonte de variação está presente entre os indivíduos (92,06%), sendo dentro dos grupos de 5,39% e entre os grupos de 2,55%. Os valores de  $F_{ST}$  e  $F_{IS}$ , estatisticamente significativos para esta análise, foram de 0,025 e 0,055, respectivamente.

**Tabela 12:** Análise da variância molecular (AMOVA),  $F_{ST}$  e  $F_{IS}$ , utilizando marcadores microssatélite para a população de *Leporinus friderici* das escadas para transposição de peixes das UHEs de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

População	Fonte de variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	$F_{ST}$	$F_{IS}$
Complexo Canoas	Entre os grupos	6	10,975	0,02222	2,55	0,025*	0,055*
	Entre indivíduos dentro dos grupos	140	125,539	0,04699	5,39		
	Dentro de indivíduos	147	118,000	0,80272	92,06		
	Total	293	254,514				

\* valores significativos a 5% de probabilidade com 1000 permutações. g.l. = graus de liberdade;  $F_{ST}$  = Índice de Fixação de Alelos;  $F_{IS}$  = Índice de Fixação Intrapopulacional

## DISCUSSÃO

Segundo Torres et al. (2004), inúmeros trabalhos foram realizados com marcadores moleculares nos últimos anos, devido ao surgimento de técnicas de resolução de polimorfismos de DNA. De acordo com esses autores, no que diz respeito aos peixes de água doce, a região neotropical é caracterizada como a mais diversificada em número de espécies e densidade populacional, e a biologia molecular disponibiliza ferramentas capazes de acessar a variação molecular existente nesses grupos e relacioná-las a fatores ambientais e antrópicos. Com base nisso, marcadores moleculares hiper-variáveis como RAPD e microssatélites são úteis nos estudos que visam estimar a variabilidade e a estrutura genética de uma espécie.

De acordo Oliveira et al. (2006), estudos populacionais utilizando marcadores microssatélites tem sido cada vez mais utilizados, visto as características codominantes destes marcadores e sua alta taxa evolutiva. Porém, os custos para obtenção destes marcadores ainda são relativamente alto, o que se torna um fator limitante para muitas pesquisas. Neste panorama, uma medida alternativa pode ser adotada, fazendo uso de *primers* já isolados de locos microssatélites para espécies filogeneticamente próximas. Este processo é denominado de transferabilidade, sendo que os *primers* utilizados são ditos heterólogos.

Morelli et al. (2007) isolaram oito locos (Lmac 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08 e 09) de microssatélites para *Leporinus macrocephalus*, para os quais desenvolveram os pares de *primers*, além disso testaram o seu potencial de transferabilidade para outras oito espécies de peixes da família Anostomidae para tanto utilizaram cinco indivíduos de cada espécie. Dentre as espécies testadas, *L. friderici* teve sete locos amplificados, sendo seis polimórficos (Lmac 03, 05, 06, 07, 08 e 09) e um monomórfico (Lmac 04). Apenas com o loco Lmac02 os autores citados não obtiveram sucesso no processo de transferência. No presente trabalho, foram testados os oito locos de *L. macrocephalus* em *L. friderici* coletados nas escadas para

transposição de peixes no Complexo Canoas, com um número amostral maior (Tabela 1) e com modificações na reação e no programa de amplificação do DNA. No preparo da reação de amplificação as modificações realizadas foram nas concentrações dos reagentes com a finalidade de obtenção de uma melhor qualidade das bandas durante o processo de eletroforese. No programa de amplificação as adequações incluíram a diminuição da temperatura de anelamento dos *primers* para a redução da estringência, concomitante com a modificação do programa de ciclagem das amostras em termociclador. Com estas alterações, todos os locos apresentaram potencial para serem utilizados, inclusive o loco Lmac 02. Os quatro locos utilizados no atual estudo foram aqueles cujos *primers* apresentaram melhor eficiência de amplificação e permitiram a detecção de polimorfismo nos grupos de *L. friderici*.

A falta de parâmetros qualitativos para classificação da variabilidade genética de populações dificulta o monitoramento destes índices, portanto torna-se necessário que haja um prévio detalhamento da representatividade dos valores a eles atribuídos. Como a utilização das técnicas de RAPD e microsátélites permite gerar uma grande quantidade de polimorfismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), para o presente estudo foi estabelecido que valores de variabilidade genética compreendidos: entre zero e 19% seriam considerados como variabilidade genética baixa, entre 20% e 39% moderada, entre 40% e 59% como alta e acima de 60% como variabilidade genética muito alta.

De acordo com os critérios de análise adotados, a análise intrapopulacional de *L. friderici* proporcionou estimativas de valores para variabilidade e diversidade genética considerados de moderados tendendo a alto para populações naturais, sendo que com o marcador RAPD, os valores da proporção de sítios polimórficos  $P_s$  foram acima de 40% e a diversidade gênica média para todos os locos ( $\pi_n$ ) com valores maiores que 0,18 (Tabela 3).

Com os marcadores microssatélite foram estimados para os diferentes grupos de *L.*

*friderici* valores acima de 0,341, 038 e 0,35 para heterozigosidade média observada, esperada e diversidade gênica para todos os locos, respectivamente, sendo a heterozigosidade média total observada (H) e a heterozigosidade média total esperada (h) de 0,40245 e 0,44516, respectivamente (Tabela 9).

Em populações naturais DeWoody e Avise (2000) observaram que os níveis médios de variação genética dados pela  $\bar{H}_o$  em locos microssatélites para peixes de água doce ( $0,54 \pm 0,25$ ) foram similares àqueles encontrados nos outros grupos de animais ( $0,60 \pm 0,16$ ). Observaram ainda que peixes marinhos apresentaram níveis significativamente mais altos de variação genética ( $0,77 \pm 0,19$ ); populações analisadas de peixes anádromos (ex: salmão) geralmente apresentaram valores intermediários entre populações de espécies marinhas e de água doce. Desta forma, o valor estimado de heterozigosidade média total observada (H) de 0,403 (Tabela 9) para *L. friderici*, uma espécie migradora e potamodroma (vive e faz migrações reprodutivas em água doce) está de acordo com o valor estimado por DeWoody e Avise (2000) para as espécies de peixes de água doce.

Os possíveis motivos pelos quais populações naturais apresentam uma alta taxa de diversidade genética, segundo Nei (1987), é que estas possuem um grande tamanho populacional, heterogeneidade ambiental e características intrínsecas à história de vida da espécie que favorecem o rápido crescimento populacional. Segundo DeWoody e Avise (2000) a tendência de peixes marinhos apresentarem uma taxa de variação genética maior que peixes de água doce provavelmente está associado aos tamanhos populacionais efetivos, em média maiores daquelas espécies, os quais podem estar relacionados à natureza maior e mais contínua dos ambientes marinhos. Populações de peixes de água doce são limitadas a drenagens particulares por tempos evolutivos curtos a moderados, e então, devem ser menores em tamanho que muitas populações marinhas às quais são abertas para potenciais trocas genéticas em áreas muito maiores. Uma possibilidade sugerida é que, ao longo de séculos ou

milênios, o mar frequentemente seria um ambiente menos hostil que lagos e rios, significando que suas populações em geral poderiam ser menos suscetíveis a reduções drásticas de populações (DeWOODY; AVISE, 2000).

Alguns trabalhos realizados com espécies de peixes migradoras coletadas nas escadas de transposição do Complexo Canoas, utilizando marcadores RAPD, revelaram valores de variabilidade genética, estimada pela proporção de locos polimórficos, semelhante ou maiores aos estimados para *L. friderici*: 42% para *Salminus brasiliensis* (LOPES et al., 2007), 74% para *Prochilodus lineatus* (PAULA, 2006), 70% para *Leporinus elongatus* (RAMOS, 2007) e 60 % para *Schizodon nasutus* (TSUCHIYA, 2006). Chiari e Sodré (2001) realizaram um estudo baseado em análises de RAPD de oito espécies da família Anostomidae, coletados no rio Tibagi, nas proximidades do Complexo Canoas. Dentre as espécies analisadas, *L. friderici* apresentou uma estimativa da propor o de locos polimórficos de 46,3%, num total de 149 locos analisados, o que mostra uma concordância deste valor ao encontrado neste presente estudo com 137 locos (  $P_s = 43,4\%$ , Tabela 3).

Paula (2006) e Ramos (2007) realizaram também análises com marcadores micros telites, sendo que os valores estimados de heterozigosidades média esperada de 0,91 e 0,89, respectivamente, são considerados muito altos e maiores que o estimado para *L. friderici* (0,44, Tabela 9).

No presente estudo, as estimativas de variabilidade genética tanto com os marcadores de RAPD (Tabela 3) como de micros telites (Tabela 9) mostraram-se compatíveis, ou seja, com ambas as metodologias observou-se que os grupos analisados apresentam índices de variabilidade considerados bons, como já discutido anteriormente, bem como os índices médios (Tabelas 3 e 9) obtidos para a espécie nessa região do rio Paranapanema.

Estudos da diversidade genética de diversas espécies de peixes têm sido realizados com diferentes classes de marcadores moleculares. Os diferentes níveis de variabilidade entre

as classes de marcadores refletem um equilíbrio entre as taxas de mutação e deriva genética.

As taxas de mutação para marcadores microssatélites são estimadas entre  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  por loco por geração, enquanto para marcadores RAPD essas taxas têm valores de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  por loco por geração (LOUGHEED et al., 2000).

Os marcadores microssatélite são considerados mais informativos (detecção de heterozigotos), porém os locos utilizados podem não ter detectado toda a possível diferenciação existente entre os grupos amostrados. Segundo Selkoe e Toonen (2006), cada loco microssatélite pode ser considerado uma amostra do genoma. Devido à recombinação, seleção e deriva genética, genes e regiões diferentes do genoma têm histórias genealógicas ligeiramente diferentes. O uso de um único loco (ou poucos) para estimar características populacionais a partir de dados genéticos cria uma alta taxa de erro de amostragem. Assim, a análise de múltiplas amostras do genoma, pela combinação dos resultados de muitos locos, fornece uma maneira mais precisa e estatisticamente mais poderosa de comparar populações e indivíduos. Outro fator a ser considerado é sobre a dominância dos marcadores moleculares, pois marcadores dominantes, como no caso do RAPD, deve-se partir da premissa que as populações naturais estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para se estimar os parâmetros genéticos de diversidade, variabilidade e estrutura populacional. Além do número de locos analisados, o tamanho amostral é um fator a ser ponderado, sendo que quanto maior é o número de indivíduos analisados, mais precisa é a estimativa dos parâmetros.

Quando considerada a análise inter-populacional I os resultados obtidos com a AMOVA, mostram-se muito semelhantes. Os dados com RAPD mostram que entre os grupos de *L. friderici* de Canoas I (Tabela 5) a maior fonte de variação é dentro dos grupos (95,29 %) e não entre eles (4,71 %) sendo o  $F_{ST} = 0,047$ ; para os grupos de Canoas II esses valores foram 97,83%, 2,17% e 0,022, respectivamente. Com os marcadores microssatélites (Tabela 10) os resultados da AMOVA também mostram que a maior fonte de variação está dentro dos

grupos e não entre os mesmos tanto para os grupos de Canoas I como Canoas II, sendo que para os grupos de *L. friderici* de Canoas I o  $F_{ST} = 0,014$  e para aqueles de Canoas II o  $F_{ST} = 0,016$ . Os valores de  $F_{ST}$  com ambos os marcadores, mesmo que significativos, indicam que a diferenciação genética existente entre os grupos de *L. friderici* de Canoas I e entre aqueles de Canoas II é considerada baixa ( $< 0,05$ ) de acordo com os critérios adotados, baseados em Wright (1978).

Na análise inter-populacional II, onde os grupos de *L. friderici* de Canoas I e Canoas II foram considerados como uma única população constituída de sete subpopulações, os dados da AMOVA obtidos através dos marcadores de RAPD (Tabela 6), revela que a maior fonte de variação está presente dentro dos grupos (90,97%) e não entre os grupos (9,03%). O valor estimado para  $F_{ST}$  (0,09) é significativo e segundo os critérios adotados indica uma diferenciação moderada entre os grupos de *L. friderici*. Esse dado é concordante com aqueles de distância genética (Tabela 4) e de  $F_{ST}$  par a par (Tabela 7) onde os maiores valores estimados para estes parâmetros são aqueles das comparações entre os grupos de Canoas I e Canoas II.

Nessa análise utilizando os marcadores de microssatélites pode ser observado que os maiores valores de  $F_{ST}$  par a par (Tabela 11) estão entre as comparações dos grupos de *L. friderici* provenientes de Canoas I com aqueles de Canoas II. Isto pode ser devido que apesar de alguns alelos apresentarem certa uniformidade na sua frequência dentro dos grupos, a presença de alelos pouco frequentes ou até mesmo ausentes em alguns grupos são fatores que podem influenciar os resultados dos testes estatísticos. Por exemplo, na distribuição das frequências alélicas do loco Lmac 02 (Figura 3) nota-se que o alelo 5 está ausente dos grupos

de Canoas I, assim como o alelo 4 está ausente no grupo 6, fato que pode ser observado para os outros locos analisados. A AMOVA (Tabela 12) mostrou também que a maior porcentagem de variação está dentro e não entre os grupos, mas o valor estimado de  $F_{ST}$

(0,025) indica diferentemente daquele obtido com RAPD, uma baixa diferenciação genética entre os grupos de *L. friderici*.

Resultados semelhantes de baixa diferenciação genética foram estimados para *P. lineatus*,  $F_{ST} = 0,0017$ , (Paula, 2006) e  $F_{ST} = 0,026$  para *L. elongatus* (RAMOS, 2007). Em ambos os estudos também foram mostrados que a maior porcentagem de variação está contida dentro dos grupos e não entre os grupos.

O valor estimado de  $F_{IS}$  (0,055) (Tabela 12) indica que o endocruzamento também é baixo entre os grupos de *L. friderici*. Devemos considerar o fato que populações naturais em equilíbrio possuem tamanho populacional grande, de forma que não haja endocruzamento entre espécimes e com variabilidade genética suficiente para sua manutenção no meio ambiente. O índice de diferenciação genética moderada obtido com os marcadores RAPD pode ser devido ao tamanho amostral menor (Tabela 1) e pelo fato de ser um marcador dominante onde para realizar a estimativas dos parâmetros genéticos deve-se partir da premissa que os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, como já mencionado anteriormente. Por outro lado, os dados obtidos com microssatélites, marcador codominante e que permite a identificação de heterozigotos, e para o qual foi analisado um maior número de indivíduos (Tabela 1), foi possível observar que os quatros locos analisados na maioria dos sete grupos *L. friderici* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 8). Além disso, o alelo mais freqüente desses locos tem o mesmo comportamento nos diferentes grupos. Esses fatos contribuíram para obtenção de um índice de diferenciação genética mais preciso e de menor valor ( $F_{ST} = 0,025$ ). Esses resultados sugerem fortemente que os grupos de *L. friderici* coletados nas escadas para transposição de peixes do Complexo Canoas constituem uma única população formada por sete subpopulações.

Após a construção da UHE e Escola Mackenzie e formação do reservatório Capivara em 1975 (Figura 1), por vinte e três anos existiu um trecho de fluxo livre no médio rio

Paranapanema compreendido entre esta barragem e a de Salto Grande, o qual era em grande parte de águas lólicas (SAMPAIO, 1944; PELICICE; AGOSTINHO 2007). Segundo estes autores, a barragem da usina de Salto Grande provavelmente não impedia o recrutamento anual das populações de grandes peixes migradores, visto que anterior a construção desta barragem, em 1956, as espécies de peixes não transpunham este trecho pela presença de uma queda d'água (Salto Grande) que impedia esta migração à montante. Com isso, a reposição de estoques de peixes, era feita pelos afluentes que desembocam no trecho do reservatório Capivara. Como importantes tributários do reservatório de Capivara, estão os rios Tibagi, das Cinzas, Congonhas, Capivara e Laranjinha, os quais preservam condições lólicas que favorecem espécies migratórias, provavelmente atuando como locais para a reprodução. Após a construção das UHEs do Complexo Canoas em 1999 (DUKE ENERGY, 2003) os cerca de 50 km, entre a barragem de Canoas I e a de Salto Grande (Figura 1), passaram a configurar um cenário de dois novos reservatórios seqüenciais caracterizados por cobrir áreas sem a presença de grandes rios afluentes, porções lólicas extremamente curtas, margens ocupadas por pastagens, com escassos remanescentes de vegetação ciliar e com ausência total de lagoas marginais (BRITTO; SIROL, 2005; LOPES et al., 2007; PELICICE; AGOSTINHO, 2008), criando condições desfavoráveis para a manutenção de espécies de peixes migradores.

Segundo Suzuki (1999) o sucesso de ocupação e permanência das espécies num dado ecossistema está amplamente associado a um processo de reprodução bem sucedido. O sucesso reprodutivo dos grandes peixes migradores Neotropicais depende basicamente da realização de migrações anuais por longos trechos de rios a procura de locais propícios à desova e desenvolvimento da prole. As escadas para transposição de peixes seriam mecanismos facilitadores do processo migratório, tornando trechos barrados permeáveis, contudo, em muitos casos têm se mostrado um fator de impacto adicional às espécies migradoras (SUZUKI, 1999).

De acordo com Pelicice e Agostinho (2008), as condições criadas pela formação de reservatórios, como qualidade ruim das águas e ausência de locais para reprodução nas áreas a jusante, fluxo unidirecional das águas e turbilhamento causado pela água nas escadas de transposição, são atrativos para a transposição dos peixes, fazendo com que os peixes localizados a jusante da barragem migrem para área a montante. Considerando que as áreas a montante, reservatórios de Canoas I e Canoas II, não apresentam condições favoráveis para a consolidação do processo reprodutivo, pela observação de ausência de ovos, larvas e juvenis, conforme estudo realizado por Britto e Sirol (2005), torna-se nítido o fato de que peixes localizados a jusante das barragens são incentivados a migrarem para áreas acima, porém a não consolidação da reprodução, leva a confirmar a hipótese que a longo prazo, os mecanismos de transposição instalados nas barragens, constituem verdadeiras armadilhas ecológicas, acentuando a redução dos estoques de peixes nas área a jusante (PELICICE; AGOSTINHO, 2008).

É fato também, que na presença de ambientes desfavoráveis para a desova, peixes migradores procuram rotas alternativas para a realização deste processo, conforme observaram Antonio et al. (2007) no rio Paraná.

Embora os espécimes de *L. friderici* tenham sido coletados em dois locais distintos (escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II), a origem desta espécie a jusante é comum, sendo ela o Reservatório de Capivara, que tem como principais afluentes os rios das Cinzas e Tibagi. A ausência de afluentes importantes nos reservatórios de Canoas I e Canoas II e a não consolidação do processo reprodutivo nesses reservatórios, vêm reforçar a idéia de que a fonte de novos espécimes seja realmente a população do Reservatório Capivara localizado a jusante do Complexo Canoas. Com essa informação, é de se esperar que os dados apontem uma baixa tendência à estruturação genética dos grupos, visto que um mesmo local mantém-se como fonte da população desta espécie.

Os valores estimados de variabilidade genética para a população de *L. friderici* para essa região do médio Paranapanema, são considerados bons. Porém, a migração unidirecional dos reprodutores, ausência de prole, a prática da pesca predatória neste local, assim como o repovoamento com espécimes cultivados em aquículturas com características genéticas diferentes a da população natural e/ou com baixa variabilidade genética são fatores que a médio e longo prazo deverão alterar a estrutura genética dessa população, podendo acarretar na depleção dos estoques naturais a jusante (reservatório Capivara).

Com isso, ressalta-se a importância da conservação dos principais afluentes, rios Tibagi e das Cinzas, neste trecho do rio Paranapanema, para que assim, as espécies migradoras possam encontrar ambientes favoráveis para procriação ao invés de transporem as escadas do Complexo Canoas, as quais deveriam permanecer fechadas no período reprodutivo.

A manutenção dos estoques de *L. friderici* nos reservatórios de Canoas I e Canoas II devem ser realizadas pela abertura das escadas para transposição de peixes fora do período reprodutivo ou pelo repovoamento com juvenis produzidos com matrizes provenientes do reservatório Capivara. A reprodução assistida poderá garantir um estoque repovoador com as características genéticas identificadas neste trabalho para a população natural de *L. friderici* pertencente a esta região do rio Paranapanema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affonso PRAM e Galetti Jr PM (2007) Genetic diversity of three ornamental reef fishes (Families Pomacanthidae and Chaetodontidae) from the Brazilian coast. *Braz J Biol*, 4:925–933.

Agostinho AA e Gomes LC (2005) O Manejo da Pesca em Reservatórios da Bacia do Alto Rio Paraná: Avaliação e Perspectivas. In: Nogueira MG, Henry R e Jorcin A (Orgs.) *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata*. Ed. RiMa, São Carlos, pp23–55.

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

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

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

Antonio RR, Agostinho AA, Pelicice FM, Bailly D, Okada EK e Dias JHP (2007) Blockage of migration routes by dam construction: can migratory fish find alternative routes? *Neotrop Ichthyol* 2:177–184.

Britto SG e Sirol RN (2005) Transposição de Peixes como Forma de Manejo: As Escadas do Complexo Canoas, Médio Rio Paranapanema, Bacia do Alto rio Paraná. In: Nogueira MG, Henry R e Jorcin A (Orgs.) *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, A es de Manejo e Sistemas em Cascata*. 1  ed. Ed. RiMa, São Carlos, pp 285 – 304.

Bruschi FL (2005) Crescimento e Mortalidade de *Leporinus friderici* (Bloch, 1974), *Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850 e *Schizodon nasutus* Kner, 1858 (Ostariophysi, Anostomidae) na Represa Capivara (UHE Escola de Engenharia Mackenzie), Rio Paranapanema. Disserta o (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 51pp.

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

CESP – Companhia Energética de São Paulo (2000) Complexo Canoas: Programa de Monitoramento da Qualidade da água e Manejo da Ictiofauna. São Paulo.

Chiari L e Sodr e LMK (2001) Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis. *Acta Scient* 2:445–451.

DeWoody JA e Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J Fish Biol* 56:461–473.

Duke Energy – Geração Paranapanema (2003) Peixes do Rio Paranapanema. Horizonte Geográfico, São Paulo, 112 pp.

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

Excoffier L, Laval A e Schneider S (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online* 1:47-50.

Godoy MP (1975) Subordem Characoidei. In: . Peixes do Brasil: Bacia do Rio Mogi Guassu. Franciscana, Piracicaba, pp 539–552.

Godoy MP (1987) Peixes do Estado de Santa Catarina. ELETROSUL, Florianópolis, 571pp.

Guo S e Thompson E (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples alleles. *Biometrics* 48:361-372.

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

Lopes CM, Almeida FS, Orsi ML, Britto SGC, Sirol RN e Sodré LMK (2007) Fish passage ladders from Canoas Complex – Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). *Neotrop Ichthyol* 2:131–138.

Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA e Weatherhead PJA (2000) Comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the *Massasauga rattlesnake*. *J Hered* 6:458–463.

Lowe-McConnell RH (1999) Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. EDUSP, São Paulo, 535 pp.

Lowe A, Harris S e Ashton P (2004) *Ecological Genetics: Design, Analysis and Application*. Blackwell Publishing, Malden, 326 pp.

Lynch M e Milligan BG (1994) Analysis of population structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3:91–99.

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

Morelli KA, Revaldaves E, Oliveira C e Foresti F (2007) Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. *Mol Ecol Notes* 7:32-34.

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

Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512pp.

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R e Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 2:294–307.

Paiva SR, Dergam JA e Machado F (2006) Determining management units in southeastern Brazil: The Case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Hydrobiologia* 1:393-404.

Paula FM (2006) Diversidade Genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) das Escadas de Transposição de Peixes das Usinas Hidroelétricas do Complexo Canoas – Rio Paranapanema. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 125 pp.

Pelicice FM e Agostinho AA (2008) Fish passage facilities as ecological traps in large neotropical Rivers. *Conserv Biol* 22:180-188.

Ramos JVB (2007) Estudo da Estrutura Genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no Complexo Canoas – Rio Paranapanema. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 83 pp.

Sampaio T (1944) Relato sobre os estudos efetuados nos rios Itapetininga e Paranapanema. *Rev I Geogr Geol* 2:30-81.

Selkoe KA e Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Let* 9:615–629.

Suzuki HI (1999) Estratégias Reprodutivas de Peixes Relacionadas ao Sucesso na Colonização em Dois Reservatórios do Rio Iguaçu-PR, Brasil. Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 97 pp.

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

Tshuchiya MTN (2006) Análise da Estrutura Genética de *Schizodon nasutus* (Pisces, Characiformes) das Escadas de Transposição de Peixes das UHEs do Complexo Canoas – Rio Paranapanema. Monografia (Bacharelado) Universidade Estadual de Londrina, 62 pp.

Wright S (1951) The genetical structure of population. *Ann Eugen* 15:323-354.

Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations*. Volume 4. Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago, 9-103 pp.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- Affonso PRAM e Galetti Jr PM (2007) Genetic diversity of three ornamental reef fishes (Families Pomacanthidae and Chaetodontidae) from the Brazilian coast. *Braz J Biol*, 4:925–933.
- Agostinho AA e Gomes LC (1997) Reservatório de Segredo: Bases Ecológicas para o Manejo. EDUEM, Maringá, 319-364 pp.
- Agostinho AA e Gomes LC (2005) O Manejo da Pesca em Reservatórios da Bacia do Alto Rio Paraná: Avaliação e Perspectivas. In: Nogueira MG, Henry R e Jorcin A (Orgs.) *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata*. Ed. RiMa, São Carlos, 23–55 pp.
- Agostinho AA, Gomes LC, Fernandez DR e Suzuki HI (2002) Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. *River Res and Applic* 18:299–306.
- Agostinho AA, Julio Jr HF e Borghetti JR (1992) Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. *Rev Unimar* 14:89-107.
- Ali BA, Huang T, Qin D e Wang X (2004) A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Rev Fish Biol and Fisher* 4:44–53.
- Almeida FS, Fungaro MHP e Sodr e LMK (2001) RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi river, Brazil. *J Zool* 253:113–120.
- Almeida FS, Sodr e LMK e Contel EPB (2003) Population structure of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiet e and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genet Mol Biol* 3:30–305.
- Alzuguir F (1994) Histórico da Legisla o Referente   Prote o dos Recursos Ict licos de  gua Doce, Seminário Sobre Fauna Aquática e o Setor Elétrico Brasileiro, MME – Ministério de Minas e Energia, ELETROBRÁS - Centrais Elétricas Brasileiras S.A., COMBASE – Comit  Coordenador das Atividades de Meio Ambiente do Setor Elétrico, Rio de Janeiro , Brasil.
- Antonio RR, Agostinho AA, Pelicice FM, Bailly D, Okada EK e Dias JHP (2007) Blockage of migration routes by dam construction: can migratory fish find alternative routes? *Neotrop Ichthyol* 2:177–184.

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

Britto SG e Sirol RN (2005) Transposição de Peixes como Forma de Manejo: As Escadas do Complexo Canoas, Médio Rio Paranapanema, Bacia do Alto rio Paraná. In: Nogueira MG, Henry R e Jorcin A (Orgs.) *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata*. 1º ed. Ed. RiMa, São Carlos, 285 – 304 pp.

Bruschi FL (2005) Crescimento e Mortalidade de *Leporinus friderici* (Bloch, 1974), *Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850 e *Schizodon nasutus* Kner, 1858 (Ostariophysi, Anostomidae) na Represa Capivara (UHE Escola de Engenharia Mackenzie), Rio Paranapanema. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 51pp.

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

CESP – Companhia Energética de São Paulo (1998) *Conservação e Manejo nos Reservatórios: Limnologia, Ictiologia e Pesca*. São Paulo.

CESP – Companhia Energética de São Paulo (2000) *Complexo Canoas: Programa de Monitoramento da Qualidade da Água e Manejo da Ictiofauna*. São Paulo.

Chiari L e Sodr e LMK (2001) Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis. *Acta Scient* 2:445–451.

Chistiakov DA, Hellemans B e Volckaert FAM (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255:1–29.

Dantas GPM (2007) *Biologia Reprodutiva, Estrutura Populacional e Variabilidade Genética de *Larus dominicanus**. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 120 pp.

DeWoody JA e Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J Fish Biol* 56:461–473.

Dias JHP (2003) *Distribuição Espacial e Temporal da Ictiofauna do Trecho Médio do Rio Paranapanema e suas Relações com as Características Morfométricas e Limnológicas dos Compartimentos da Bacia*. Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 103 pp.

Duke Energy – Geração Paranapanema (2003) Peixes do Rio Paranapanema. Horizonte Geográfico, São Paulo, 112 p.

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

Excoffier L, Laval A and Schneider S (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online* 1:47-50.

FAO (Food and Agriculture Organization) (2004) The State of World Fisheries and Agriculture (SOFIA). Rome: FAO.

Ferreira ME e Grattapaglia D (1998) Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 3º ed. Embrapa, Brasília, 220 pp.

Frankham R, Ballou JD e Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics, Cambridge University Press, Cambridge UK, 617 pp.

Fungaro MHP e Vieira MLC (2001) Marcadores Moleculares. In Azevedo JL, Barros NM e Serafini LA (orgs) Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, 153-200 pp.

Futuyma D J (1997) Biologia Evolutiva. 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, 646 pp.

Garavello JC (1979) Revisão Taxonômica do Gênero *Leporinus* SPIX, 1829 (Ostariophysi, Anostomidae). Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 451 pp.

Garavello JC e Britski HA (2003) Family Anostomidae. In: Reis RE, Kullander SO e Ferraris CJ (Eds.) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, 71 – 84 pp.

Genovart ML, Oro D e Bonhomme F (2003) Genetic and morphological differentiation between two largest breeding colonies of Audouin's Gull *Larus audouinii*. *Ibis*, 145:448–456.

Godoy MP (1975) Subordem Characoidei. In: . Peixes do Brasil: Bacia do Rio Mogi Guassu. Editora Franciscana, Piracicaba, 539–552 pp.

Godoy MP (1987) Peixes do Estado de Santa Catarina. ELETROSUL, Florianópolis, 571 pp.  
Goulding M (1980) The Fishes and The Forest: Explorations in Amazonian Natural History. University of California Press, Berkley, 280 pp.

Guo S e Thompson E (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples alleles. *Biometrics* 48:361-372.

Hahn NS, Agostinho AA, Gomes LC e Bini LM (1998) Estrutura trófica da ictiofauna do reservatório de Itaipu nos primeiros anos de sua formação. *Interciencia* 23:299-305.

Hancock JM (2000) Microsatellites and Other Simple Sequences: Genomic Context and Mutational Mechanisms. In: Goldstein DB e Schlotterer C (Ed.) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, 1-9 pp.

Hassanien HA, Elnady M, Obeida A e Itriby H (2004) Genetic diversity of Nile Tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Aquac Res* 35: 587-593.

Hey J e Machado CA (2003) The study of structured populations – new hope for a difficult and divided science. *Nat Rev* 4:535–543.

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

Hoffmann AC (2003) Análise da Ictiofauna do Reservatório da UHE Escola Mackenzie, rio Paranapanema (Estados de São Paulo e Paraná). Dissertação (mestrado) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 144 pp.

Huang C, Lin Y e Chen J (2005) The use of RAPD markers to assess catfish hybridization. *Biodivers Conserv* 12:3003–3014.

Jayasankar P (2004) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting resolves species ambiguity of domesticated clown fish (genus: *Amphiprion*, family: Pomacentridae) from India. *Aquac Res* 10:1006–1009.

Karasawa MMG (2005) Análise da Estrutura Genética de Populações e Sistema Reprodutivo de *Oryza glumaepatula* por Meio de Microsatélites. Tese (doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz Carlos de Queiroz/USP, Piracicaba, 92 pp.

Levin PS e Schiewe MH (2001) Preserving salmon biodiversity. *Am Sci* 4:220–227.

Liu ZJ e Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238:1–37.

Lopes CM, Almeida FS, Orsi ML, Britto SGC, Sirol RN e Sodr e LMK (2007) Fish passage ladders from Canoas Complex – Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). *Neotrop Ichthyol* 2:131–138.

Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA e Weatherhead PJA (2000) Comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the *Massasauga rattlesnake*. *J Hered* 6:458–463.

Lowe-McConnell RH (1987) *Ecological Studies in Tropical Fish Communities*. Cambridge University Press, Cambridge, 382 pp.

Lowe-McConnell RH (1999) *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. EDUSP, São Paulo, 535 pp.

Lowe A, Harris S e Ashton P (2004) *Ecological Genetics: Design, Analysis and Application*. Blackwell Publishing, Malden, 326 pp.

Lynch M e Milligan BG (1994) Analysis of population structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3:91–99.

Marciano FT (2005) *Composi o, Abundância e Aspectos Reprodutivos das Espécies de Peixes do Reservatório  lvaro de Souza Lima (Bariri, SP) e sua Rela o com as Características Ambientais do Sistema*. Tese (doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos, 236 pp.

Martins SL e Tamada K (2000) *Sistemas para a Transposi o de Peixes*. In: *Boletim Técnico da Escola Politécnica da USP*. São Paulo.

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

Morelli KA, Revaldaves E, Oliveira C e Foresti F (2007) Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. *Mol Ecol Notes* 7:32-34.

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

Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512pp.

Nelson JS (1994) *Fishes of the World*. 3<sup>o</sup> ed. John Wiley & Sons. New York, 600 pp.

Nogueira MG, Jorcin A, Vianna NC e Britto YCT (2005) Reservatórios em Cascata e os Efeitos na Limnologia e Organização das Comunidades Bióticas (Fitoplâncton, Zooplâncton e Zoobentos) – Um Estudo de Caso no Rio Paranapanema. In: Nogueira MG Henry R e Jorcin A (Orgs.) *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata*. 1<sup>o</sup> ed. Ed. RiMa, São Carlos, 83 – 125 pp.

Oliveira AV, Prioli AJ, Prioli SMAP, Bignotto TS, Júlio JR HF, Carrer H, Agostinho CS e Prioli LM (2006 [a]) Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. *J Fish Biol* 69:260-277.

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R e Vieira MLC (2006[b]) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 2:294–307.

Ormerod SJ (2003) Current issues with fish and fisheries: editor's overview and introduction. *J Appl Ecol* 40:204–213.

Orsi ML (2005) *Caracterização das Estratégias Reprodutivas na Assembléia de Peixes do Reservatório de Capivara, Rio Paranapanema, Região Sudeste, Brasil*. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 114 pp.

Paiva SR, Dergam JA e Machado F (2006) Determining management units in southeastern Brazil: The case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Hydrobiologia* 1:393-404.

Paula FM (2006) *Diversidade Genética de Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) das Escadas de Transposição de Peixes das Usinas Hidroelétricas do Complexo Canoas – Rio Paranapanema. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 125 pp.

Pelicice FM e Agostinho AA (2008) Fish passage facilities as ecological traps in large neotropical Rivers. *Conserv Biol* 22:180-188.

Perez-Sweeney BM, Rodrigues FP e Melnick DJ (2003) Metodologias Moleculares Utilizadas em Genética da Conservação. In: Cullen LJ, Rudran R e Valadares-Padua C (Orgs.) Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre. Ed. UFPR, Curitiba, 343-380 pp.

Ramos JVB (2007) Estudo da Estrutura Genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no Complexo Canoas – Rio Paranapanema. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 83 pp.

Ribeiro Filho RA (2006) Relações Tróficas e Limnológicas no Reservatório de Itaipu: Uma Análise do Impacto da Biomassa Pesqueira nas Comunidades Planctônicas. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos, 154 pp.

Rubin CS, Warner RE, Bouzat JL e Paige KN (2001) Population structure of Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*) in a urban landscape. *Biol Conserv* 99:323 – 330.

Sampaio T (1944) Relato sobre os estudos efetuados nos rios Itapetininga e Paranapanema. *Rev I Geogr Geol* 2:30-81.

Sanches A e Galetti Jr PM (2007) Genetic evidence of population structuring in the neotropical fresh water fish *Brycon hilarii* (Valencinnes, 1850) *Braz J Biol* 4:889–895.

Selkoe KA e Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Let* 9:615–629.

Silva RG (2006) Análise da Estrutura Genética Populacional do Curimatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na Região da Bacia do Rio Grande, SP. Dissertação (mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 112 pp.

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

Solé-Cava AJ (2001) Biodiversidade Molecular e Genética da Conservação. In: Matioli SR (Ed.) *Biologia Molecular e Evolução*. Editora Holos, Ribeirão Preto, 171-190 pp.

Suzuki HI (1999) Estratégias Reprodutivas de Peixes Relacionadas ao Sucesso na Colonização em Dois Reservatórios do Rio Iguaçu-PR, Brasil. Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 97 pp.

Thomaz SM, Roberto MC e Bini LM (1997) Caracterização Limnológica dos Ambientes Aquáticos e Influência dos Níveis Fluviométricos. In: Vazzoler AEAM, Agostinho AA e Hahn NS (Eds.) A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná: Aspectos Físicos, Biológicos e Socioeconômicos. EDUEM, Maringá, 73-102 pp.

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

Tshuchiya MTN (2006) Análise da Estrutura Genética de *Schizodon nasutus* (Pisces, Characiformes) das Escadas de Transposição de Peixes das UHEs do Complexo Canoas – Rio Paranapanema. Monografia (Bacharelado) Universidade Estadual de Londrina, 62 pp.

Wasko AP, Martins C, Oliveira C, Senhorini JA e Foresti F (2004) Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *J Appl Ichthyol* 1:48–52.

Welsh J e McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. *Nucleic Acids Res* 24:7213–7218.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA e Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 22:6531–6535.

Wright S (1951) The genetical structure of population. *Ann Eugen* 15:323-354.

Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations*. Volume 4. Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago, 9-103 pp.

Zucchi MI (2002) Análise da Estrutura Genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando Marcadores SSR e RAPD. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz/USP, Piracicaba, 148 pp.