



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

JULIANO VILAS BOAS RAMOS

**ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE *Leporinus
elongatus* (PISCES, CHARACIFORMES) NO
COMPLEXO CANOAS – RIO PARANAPANEMA.**

Londrina

2007

JULIANO VILAS BOAS RAMOS

**ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE *Leporinus
elongatus* (PISCES, CHARACIFORMES) NO
COMPLEXO CANOAS – RIO PARANAPANEMA.**

Dissertação apresentada ao curso 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: Prof^a. Dr^a. Leda Maria Koelblinger Sodré.

Londrina

2007

JULIANO VILAS BOAS RAMOS

**ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE *Leporinus
elongatus* (PISCES, CHARACIFORMES) NO
COMPLEXO CANOAS – RIO PARANAPANEMA.**

Dissertação apresentada ao curso 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.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Leda Maria Koelblinger Sodré.
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Prof^ª Dr^ª Fernanda Simões de Almeida
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

**Dedico aos meus pais, Hugo Ramos e Esdra Vilas
Boas Ramos, pois muitos passam por nossas vidas, mas
estes são únicos e eternos.**

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Estadual de Londrina**, e ao **Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, EMBRAPA-Londrina e IAPAR**, pela formação concedida;

A **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado;

A **Duke Energy International – Geração Paranapanema** e a **Agência Nacional de Energia Elétrica (ANDEL)** pelo apoio financeiro ao projeto que gerou esta dissertação;

A Profa. Dra. **Leda Maria Koelblinger Sodré**, minha orientadora que me acolheu com carinho desde o segundo ano de minha gradua o e que com o tempo depositou confiança no meu trabalho, me aceitando como orientado e permitindo o desenvolvimento desta disserta o;

A Profa. Dra. **Fernanda Simões de Almeida**, grande amiga e companheira do dia a dia no laboratório, pela indispensável ajuda, orienta o e participa o na banca examinadora;

A Profa. Dra. **Silvia Helena Sofia**, pelo carinho e ajuda imediata quando necessário;

Ao Prof. Dr. **Oscar Akio Shibatta** da Universidade Estadual de Londrina pelas orienta es na correta identifica o dos espécimes capturados durante o desenvolvimento desta disserta o;

Ao grupo do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina, composto pelo Prof. Dr. **Mário Luís Orsi** e pelos amigos **Edson Santana da Silva** e **Aparecido de Souza**, pela amizade e pelos esforços nas coletas dos espécimes utilizados neste trabalho;

A **Equipe técnica de meio ambiente da Duke Energy International**, pelo auxílio nas coletas das amostras nas escadas para transposi o de peixes;

Ao professor **Paulo Maurício Ruas** por ter aceitado fazer parte da banca examinadora deste trabalho, trazendo grande colaboração ao mesmo;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral **Dário e Melissa** pela prontidão em ajudar com o uso do inter-laboratório;

A **Sueli**, secretária do Mestrado em Genética e Biologia Molecular por estar pronta a ajudar com as burocracias e problemas que surgiram durante a realização do curso;

Aos amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares em Peixes e Ecologia de Abelhas **Karen, Bruno, Mirian, Carluxa, Dalita, Douglas, Gabi, Rafael, Olavo e Leandro** pelas horas de descontração e divertimento entre um trabalho e outro;

Aos amigos **Francine Matias de Paula e Fernando Yuldi Ashikaga**, que um dia passaram por este laboratório, mas deixaram grande amizade e carinho;

A todos os **colegas da turma 2006 de Mestrado em Genética e Biologia Molecular** da Universidade Estadual de Londrina, pela convivência e companheirismo;

Aos amigos **Fernando Camargo Jerep e Vitor Mirando Prado** por todo companheirismo e amizade dispensada;

Aos meus pais **Hugo e Esdra** por terem permitido e apoiado meu trabalho e principalmente pelo amor puro e irrestrito que somente os pais sabem dar;

A minha irmã **Jucielly**, cunhado **Luiz Cesar** e sobrinhos **Pedro Luiz e Luiz Otávio** que só pela existência incentivaram o desenvolvimento desta dissertação;

A **DEUS** que está sempre presente em nossa vida, mesmo quando nos ausentamos Dele;

MEU MUITO OBRIGADO!!!!

RAMOS, JULIANO VILAS BOAS. **Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no Complexo Canoas – rio Paranapanema**. 2007. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

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 elongatus* no Complexo Canoas – rio Paranapanema – Brasil. Dez 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. elongatus* do Complexo Canoas estão estruturados como uma única população. Os dados obtidos sobre a diversidade genética e estrutura populacional de *L. elongatus* 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 aqüicultura.

Palavras-chave: escadas de transposição, RAPD, microssatélites, estrutura populacional.

RAMOS, JULIANO VILAS BOAS. **Study of genetic structure of *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) in Complexo Canoas – Paranapanema river.** 2007. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

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 elongatus* in the “Complexo Canoas” – Paranapanema river - Brazil. Ten 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, F_{ST} and AMOVA) allowed to conclude that the groups of *L. elongatus* of the “Complexo Canoas” are structured as a single population. The data obtained on the genetic diversity and population structure of *L. elongatus* 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.

Key-Words: fish ladder, RAPD, microsatellites, structure population.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Exemplar de *Leporinus elongatus*, capturado no Complexo Canoas – rio Paranapanema..... 24
- Figura 2.** Mapa mostrando a drenagem do rio Paranapanema, da nascente a foz, destacando o Complexo Canoas em sua porção média. A → UHE Canoas I e B → UHE Canoas II..... 31
- Figura 3.** Corte transversal do rio Paranapanema com todas as usinas hidroelétricas presentes em seu curso (1 → UHE Jurumirim; 2 → UHE Piraju; 3 → UHE Paranapanema; 4 → UHE Chavantes; 5 → UHE Salto Grande; 6 → UHE Canoas II; 7 → UHE Canoas I; 8 → UHE Capivara; 9 → UHE Taquaruçu e 10 → UHE Rosana. Em destaque as UHEs Canoas I e II do Complexo Canoas..... 32

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..... 41
- Figura 2.** Dendrograma de distância genética, obtido com os marcadores RAPD, entre os 10 grupos de *Leporinus elongatus* provenientes das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II - rio Paranapanema. Os números em cada um dos nós indicam os valores de consistência obtidos a partir do *bootstrapping* e os números dentro dos parênteses indicam o número de locos suportando cada nó..... 51

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

- Tabela 1.** Total de espécimes amostrados por grupo de *Leporinus elongatus* nas escadas para transposição de peixes das UHE Canoas I e II do Complexo Canoas – rio Paranapanema, para cada marcador utilizado..... 40
- Tabela 2.** Seqüências de nucleotídeos das repetições *motifs*, dos *primers* franqueadores e temperatura de anelamento (Ta) para os locos de microsatélite analisados para *Leporinus elongatus*..... 43
- Tabela 3.** Proporção de locos polimórficos (\bar{P}) obtidos com o marcador RAPD para os diferentes grupos de *Leporinus elongatus* capturados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema..... 50
- Tabela 4.** Identidade genética (diagonal superior) e Distância genética (diagonal inferior), obtidos com marcadores RAPD, para os grupos de *Leporinus elongatus* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 – 6) e Canoas II (7 – 10) – rio Paranapanema..... 50
- Tabela 5.** Análise da variância molecular (AMOVA), obtida com os marcadores RAPD, entre os grupos de *Leporinus elongatus* capturados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema..... 52
- Tabela 6.** F_{ST} por par de grupos, obtido com os marcadores RAPD, para os grupos de *Leporinus elongatus* capturados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 – 6) e Canoas II (7 – 10) – rio Paranapanema..... 52
- Tabela 7.** Locos de microsatélite analisados, número de alelos obtidos por loco e peso molecular do maior e do menor alelo de cada loco, para *L. elongatus*..... 53
- Tabela 8.** Total de haplótipos (T.H.), número médio de diferenças entre pares de haplótipos (π), divergência gênica média por loco (D.G.M.), heterozigosidade média observada (\bar{H}_o) e heterozigosidade média esperada (\bar{H}_e), obtidos com os marcadores microsatélites, para os grupos de *Leporinus elongatus* amostrados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 – 6) e Canoas II (7 – 10) – rio Paranapanema..... 55
- Tabela 9.** F_{ST} par a par entre os grupos de *Leporinus elongatus* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 – 6) e Canoas II (7 – 10) – rio Paranapanema..... 55
- Tabela 10.** Análise da variância molecular (AMOVA), obtida com os marcadores microsatélites, entre os grupos de *Leporinus elongatus* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema..... 57

Tabela 11. Estatísticas de Nei (1987) estimadas através dos locos microssatélites para os grupos de <i>Leporinus elongatus</i> das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.....	58
Tabela 12. Estatísticas de Weir e Cockerham (1984) estimadas para os locos de microssatélite nos grupos de <i>Leporinus elongatus</i> das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II –rio Paranapanema.....	58

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1.1 Peixes: Valor Econômico e Biológico.....	14
1.1.2 Variabilidade Genética e Estrutura Populacional.....	15
1.1.3 Marcadores Moleculares.....	18
1.1.4 Considerações sobre <i>Leporinus elongatus</i>	23
1.1.5 Barragens Hidroelétricas e Escadas para Transposição de Peixes.....	26
1.1.6 O rio Paranapanema e o Complexo Canoas.....	29
2 OBJETIVOS	33
3 ARTIGO	34
Resumo.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	40
Material coletado.....	40
Extração e quantificação do DNA.....	42
Amplificação do DNA.....	42
Marcadores RAPD.....	42
Marcadores microssatélites.....	43
Análise eletroforética.....	44
Marcadores RAPD.....	44
Marcadores microssatélites.....	44
Análise genética.....	45

Marcadores RAPD.....	45
Marcadores microssatélites.....	46
Resultados.....	49
Marcadores RAPD.....	49
Marcadores microssatélites.....	53
Discussão.....	59
Referências bibliográficas.....	71
4 CONCLUSÕES.....	75
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL.....	77

1 INTRODUÇÃO

Pode-se atribuir aos peixes duas grandes importâncias: a biológica e a econômica. Os peixes estão entre os mais importantes recursos naturais, tendo destaque na dieta de muitas pessoas e influenciando diretamente a economia de diversas nações. Anualmente toneladas de peixes são retiradas diretamente de populações naturais, suprimindo mais de 15% do total de proteínas necessárias à alimentação humana. A atividade pesqueira movimenta anualmente valores acima de 55 bilhões de dólares no mundo e emprega diretamente por volta de 35 milhões de pessoas.

Com mais de 25.000 espécies conhecidas, a biodiversidade e o papel ecológico dos peixes têm importância na conservação aquática, manejo de ecossistemas, restauração e controle do meio ambiente aquático. Essa biodiversidade de peixes supre não somente as necessidades alimentares com as diversas espécies exploradas, mas também pode ser utilizada no manejo de ecossistemas. Além disso, é reconhecida a 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.

No entanto, problemas afetando a produção, exploração de estoques, diversidade global, estrutura trófica, qualidade do hábitat e composição local das comunidades de peixes têm sido observados. Entre estes problemas estão as alterações causadas por barragens com fins hidroelétricos, pois a grandiosidade destes empreendimentos é proporcional às modificações que causam no ambiente onde são instalados.

A partir de 1960, cresceu o número de reservatórios hidroelétricos nos rios brasileiros. Tentativas de reduzir os impactos destes barramentos foram realizadas, porém com consideráveis ambigüidades em seus princípios e operação. Uma destas tentativas

consistiu na construção de mecanismos de transposição para peixes (por exemplo, as escadas para transposição) como meio de conservação, manejo e/ou mitigação ao impedimento da continuidade do movimento migratório nos rios barrados.

No geral, os peixes apresentam uma variabilidade fenotípica considerável quando comparados a outros vertebrados, com muitas destas variações sendo relacionadas ao ambiente, visto que muitos peixes são altamente hábeis em responder a condições ambientais favoráveis ou desfavoráveis. Toda esta variabilidade fenotípica (plasticidade adaptativa) tem uma base genética e a conservação da diversidade genotípica (variabilidade genética) é de suma importância para a manutenção das espécies de peixes.

Conhecer o grau de variabilidade genética existente dentro e entre populações de peixes permite a visualização de como estas populações estão estruturadas geneticamente, sendo importante como subsídio para o correto manejo de uma espécie. Diferentes ferramentas moleculares têm hoje em dia, permitido aos pesquisadores acessar esta variabilidade genética mediante detecção de polimorfismos de DNA.

No presente trabalho a espécie migradora neotropical *Leporinus elongatus* (Piapara) foi estudada por meio da detecção de polimorfismo de DNA utilizando as técnicas de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) e Microssatélites, com a finalidade de avaliar o grau de variabilidade genética e a estrutura genética da espécie no Complexo Canoas – rio Paranapanema.

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 PEIXES: VALOR ECONÔMICO E BIOLÓGICO

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 mostra 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 proteínas animais de que o homem necessita. De acordo com este mesmo documento, 35 milhões de pessoas são empregadas diretamente na pesca, com esta atividade pesqueira 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.

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 invasiva 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 tróficos e o transporte de nutrientes entre os ecossistemas marinhos, de água doce e terrestre.

Nelson (1994) escreve que os peixes mostram grande diversidade em suas morfologias, nos habitats que ocupam e em suas biologies, e que os peixes representam pouco mais da metade do total aproximado de 48.170 espécies de vertebrados vivos conhecidos. Há estimativas de 24.618 descrições válidas de espécies de peixes comparadas com 23.550 espécies de tetrápodes. Ainda de acordo com este autor, são hoje reconhecidas 482 famílias de peixes com espécimes vivos, sendo que oito delas contêm mais de 400 espécies com 66% delas ocorrendo em água doce. Enquanto, que de todas as espécies de peixes existentes hoje, 40% ocorrem preferencialmente em água doce.

Apesar da grande importância dos peixes para o homem, conhece-se muito pouco a respeito de sua diversidade. Provavelmente 30 a 40% da fauna de peixes neotropicais de águas interiores ainda não foram descritas. Estima-se, ainda, que cerca de 20% das espécies de água doce estejam extintas ou ameaçadas de extinção. A poluição e eutrofização, assoreamento, construção de represas e controle do regime de cheias, pesca e introdução de espécies exóticas são alguns exemplos dos impactos sofridos pelos ecossistemas aquáticos continentais brasileiros (HILSDORF; PETRERE, 2002).

Desta forma estudos sobre a biologia e a dinâmica das populações de peixes são importantes para que ações de conservação sejam efetuadas de maneira racional e competente.

1.1.2 VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL

A variação está presente, de alguma forma, em populações naturais de todos os organismos. 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; HARRIS; ASHTON, 2004).

Segundo esses autores a variação genética dentro de uma espécie é um conceito fundamental para a genética aplicada à ecologia e esta possui três componentes: diversidade genética, diferenciação genética e distância genética.

A diversidade genética é uma expressão comumente utilizada para descrever a variação herdável, encontrada dentro de entidades biológicas e que pode ser medida em três níveis: individual, populacional e de espécie. No nível individual, a diversidade pode ser encontrada em um indivíduo heterozigoto para qualquer loco particular; já no nível populacional, os alelos presentes em um loco variável são encontrados em indivíduos diferentes da mesma população. Neste caso, se existem mais que dois alelos para um mesmo loco e os organismos são diplóides, nenhum indivíduo exibirá a variação total apresentada pela população; assim, a diversidade populacional é descrita como sendo dividida entre seus indivíduos. Por fim, em nível de espécie, a variação alélica pode mudar entre populações dentro dos limites de distribuição da espécie, onde algumas populações exibem alelos que estão ausentes em outras; neste caso, diz-se que a diversidade encontra-se dividida entre populações da espécie (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004).

Enquanto 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 grupos de indivíduos, sejam estas populações ou mesmo espécies (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004).

Segundo Whiteley; Spruell; Allendorf (2004) um grande número de estudos levantou a hipótese de que fatores ecológicos e história de vida, como tamanho populacional, padrões de migração e sistema reprodutivo estão relacionados com a divergência genética entre populações, por meio dos efeitos de deriva genética e fluxo gênico.

Rubin *et al.* (2001) descrevem em seu trabalho ao menos três razões biológicas que fazem da preservação da variabilidade genética de populações naturais um dos maiores objetivos da biologia da conservação: a perda de variação genética 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 significantes para a conservação.

A variação fenotípica, que no geral os peixes exibem, é maior que em outros vertebrados, sendo esta variabilidade comum dentro e entre populações. Grande parte destas variações está diretamente relacionada ao ambiente, já que muitos peixes detêm grande plasticidade em responder a condições ambientais favoráveis ou desfavoráveis. No entanto, toda esta variabilidade fenotípica tem por trás um componente genético, a variabilidade genética, e mantê-la é crucial para a conservação das diferentes espécies de peixes (MOYLE; CECH, 2000).

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

diferenciação entre as subpopulações; sendo a diferenciação genética entendida por eles como a aquisição de frequências alélicas que diferem entre as subpopulações.

Avaliações da estrutura genética populacional fornecem um retrato genético das populações, revelando medidas de endogamia, diversidade genética e diferenciação entre os espécimes. Esses dados associados ao conhecimento de atributos como o tamanho efetivo da população, o fluxo gênico e os sistemas de acasalamento são particularmente importantes no delineamento das ações de manejo a serem adotadas. A longo prazo, as metas de conservação preocupam-se em evitar a endogamia nas populações que não são normalmente endogâmicas, permitindo a manutenção do maior potencial evolutivo possível (PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003).

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

1.1.3 MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores, utilizados nos estudos genéticos, inicialmente baseavam-se em caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual. Contudo, o advento de modernas técnicas em biologia molecular, permitiu o desenvolvimento de um

conjunto de métodos para detecção de polimorfismo genético (diversidade genética) em nível de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O desenvolvimento de marcadores genéticos baseados em DNA revolucionou a genética molecular animal, já que com esses marcadores é teoricamente possível observar e explorar a variação genética no genoma inteiro. Em nível de DNA, os tipos de variação genética que podem ser detectados são: substituição de bases, comumente referido como polimorfismo em um simples nucleotídeo (SNPs), inserções ou deleções de seqüências de nucleotídeos dentro de um loco, inversão de um segmento de DNA dentro de um loco, e rearranjos de segmentos de DNA ao redor de um loco de interesse (LIU; CORDES, 2004).

A tecnologia desenvolvida em meados da década de 1980 e denominada PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação de Polimerase em Cadeia), com sua facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade, causou uma revolução na biologia como ferramenta poderosa para estudos moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A tecnologia de PCR consiste basicamente na reprodução *in vitro* dos processos de replicação do material genético dentro das células, gerando exponencialmente, através de ciclos de replicação, bilhões de cópias de fragmentos específicos de DNA (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001), utilizando inicialmente para isso a DNA polimerase isolada de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) encontrada em fontes térmicas.

A técnica de PCR foi utilizada diretamente em muitos trabalhos científicos e, desde a sua descrição, técnicas derivadas da mesma têm sido amplamente publicadas e utilizadas. Estes trabalhos têm permitido avanços tanto em áreas básicas, como aquelas que buscam o entendimento de processos biológicos fundamentais, como em áreas aplicadas, dentre as quais estão a identificação de genótipos, diagnóstico de doenças, estudos

filogenéticos e estudos de melhoramento e conservação, abrangendo todos os grupos de seres vivos (GOULÃO *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2003; STOW; BRISCOE, 2005).

Em 1990, dois grupos americanos, (WELSH; McCLELLAND, 1990 e WILLIAMS *et al.*, 1990), desenvolveram, independentemente, a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) uma variação da tecnologia de PCR. Consistindo basicamente na amplificação do DNA genômico usando iniciadores (*primers*) curtos (da ordem de 10 nucleotídeos) e de seqüência arbitrária (WILLIAMS *et al.*, 1990). O fato dos *primers* serem curtos e, temperaturas de anelamento relativamente baixas (geralmente de 36 a 40°C) serem utilizadas, a probabilidade de amplificação de diferentes fragmentos anônimos do DNA genômico é grande, com cada fragmento (presumidamente) representando locos diferentes (LIU; CORDES, 2004).

O polimorfismo nos diferentes locos de RAPD pode ser detectado após os fragmentos de DNA amplificados serem separados em gel de agarose e corados com brometo de etídio (WILLIAMS *et al.*, 1990; LIU; CORDES, 2004). Assim, os polimorfismos de RAPD são visualizados como presença ou ausência de bandas no gel de eletroforese e podem assim ser facilmente interpretados e convertidos em dados diagnósticos de homologia molecular entre indivíduos (TORRES; MATOSO; ARTONI, 2004). A fonte deste polimorfismo ainda é incerta, mas evidências experimentais indicam que mutações de ponto, inserções e/ou deleções podem gerar tal polimorfismo ao alterarem os sítios de iniciação ou torná-los mais distantes, impedindo a amplificação de um fragmento por não complementaridade do *primer* com o sítio de iniciação, ou por estes estarem a distância superior àquela que a DNA polimerase pode percorrer (FERREIRA; GRATAPLAGLIA, 1998).

Williams *et al.* (1990) caracterizaram como dominante o comportamento genético (segregação mendeliana) dos marcadores de RAPD. A principal limitação do

marcador RAPD é essa 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). Alguns modelos estatísticos foram desenvolvidos no sentido de contornar as limitações, permitindo as estimativas de parâmetros populacionais com a utilização de marcadores dominantes (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992; LYNCH; MILLIGAN, 1994). De acordo com tais modelos deve-se assumir que os alelos dos diferentes locos não co-migram para a mesma posição em um gel e que os grupos populacionais estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (LYNCH; MILLIGAN, 1994).

Contudo, a simplicidade e rapidez na obtenção de resultados são vantagens da técnica RAPD. Outras vantagens como 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 (gerando assim um incremento no grau de polimorfismo detectado) e o baixo custo em relação a outras técnicas moleculares para a obtenção de marcadores (FERREIRA; GRATTAPLAGLIA, 1998).

A utilização de marcadores RAPD em estudos populacionais nas mais diferentes formas de organismos, é destacada por diversos autores (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990; ALMEIDA; FUNGARO; SODRÉ, 2001; CHIARI; SODRÉ, 2001; RUBIN *et al.*, 2001; ALMEIDA, SODRÉ; CONTEL, 2003; ALLNUTT *et al.*, 2003; LIU; CORDES, 2004; ALI *et al.*, 2004; WASKO *et al.*, 2004; JAYASANKAR, 2004; HUANG; LIN; CHEN, 2005; BRAHMANE, 2006).

Microsatélites, também conhecidos como seqüências simples repetidas (SSRs) ou repetições curtas em *tandem* (STRs), representam um tipo único de seqüências genômicas de DNA não codificante repetidas em *tandem*, as quais são distribuídas

abundantemente pelo genoma e demonstram altos níveis de polimorfismo alélico. São marcadores codominantes onde as seqüências 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 (CHISTIYAKOV, HELLEMANS, VOLCKAERT, 2006).

Embora os microssatélites sejam extensivamente usados em um considerável número de estudos que cobrem as mais variadas áreas da genética, a dinâmica mutacional destas regiões genômicas ainda não é bem entendida, apesar de se saber que a taxa de mutação de microssatélites é muito mais alta que de outras partes do genoma, variando de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco por geração. Vários mecanismos foram sugeridos para explicar essa taxa de mutação, incluindo erros durante a recombinação, *crossing-over* desigual e deslizamento da polimerase durante a replicação ou reparo do DNA (cf OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O sucesso no uso dos marcadores microssatélites se deve a sua abundância e grande distribuição no genoma, detecção de alto grau de polimorfismo (multialelismo) e a facilidade de análise (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Além disso, esses marcadores apresentam herança mendeliana simples e são considerados co-dominantes sendo possível à identificação dos heterozigotos (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Todos estes fatores combinados os colocam como os marcadores moleculares com maior conteúdo de informação de polimorfismo e de grande interesse para muitos estudos como mapeamento genético, estudos de DNA forense, estudo da variabilidade genética de populações e conservação/manejo dos recursos biológicos (HATANAKA; GALETTI Jr., 2003; LIU; CORDES, 2004; CHISTIYAKOV, HELLEMANS, VOLCKAERT, 2006).

No entanto, conforme Oliveira *et al.* (2006), a utilização de microssatélites tem encontrado barreiras devido ao alto custo no desenvolvimento de *primers* específicos.

Contudo vários estudos têm mostrado que pares de *primers* determinados para uma espécie podem ser utilizados para outras espécies do mesmo gênero ou para gêneros diferentes da mesma família, esse atributo dos microssatélites é conhecido como transferabilidade ou amplificação espécie-cruzada. A transferabilidade pode ser um fator importante na simplificação do uso dos microssatélites pela redução de custos, principalmente quando se trabalha com *taxa* com baixa frequência ou dificuldades de isolamento de microssatélites (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

1.1.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Leporinus elongatus*

A espécie *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1850) (Figura 1), pertence à ordem Characiformes, família Anostomidae, subfamília Anostominae. A ordem Characiformes, juntamente com a de Siluriformes, representa mais de 85% da ictiofauna dos rios Neotropicais, havendo leve predomínio dos Characiformes (LOWE-McCONNELL, 1987 apud AGOSTINHO *et al.*, 1997a). De acordo com Nelson (1994), esta ordem é representada por 10 famílias, 237 gêneros e 1.343 espécies (números aproximados) e dentro da família Anostomidae são encontrados 10 gêneros, distribuídos em duas subfamílias, com cerca de 105 espécies. *L. elongatus*, é uma espécie pertencente ao gênero *Leporinus* (Spix, 1829), o qual, segundo Garavello e Britski (1988), é um dos mais complexos entre os Characiformes, sobretudo por apresentar grande número de espécies descritas (cerca de sessenta).



Figura 1: Exemplar de *Leporinus elongatus*, capturado no Complexo Canoas – rio Paranapanema.

Garavello e Britski (2003) relatam que espécies da família Anostomidae são encontradas desde o sul da América Central até regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, não ocorrendo nenhuma espécie em rios que drenam a costa Pacífica dos Andes e, que no Brasil estão presentes nas bacias dos principais rios como Amazonas, São Francisco e Paraná. Estes autores ressaltam o fato de alguns membros de grande porte do gênero *Leporinus* e *Schizodon*, serem conhecidos por empreenderem migrações reprodutivas no sistema Paraná-Paraguai e nas bacias do Amazonas e Orinoco, sendo estes peixes explorados na pesca comercial e de subsistência como um importante item alimentar da população na América do Sul, devido a essas migrações anuais. De acordo com relatos dos mesmos autores, a espécie *L. elongatus* é distribuída somente na América do Sul, nas bacias dos rios brasileiros Paraná e São Francisco, onde é conhecida pelo nome popular de “Piapara”, e na do argentino La Plata, onde recebe o nome popular de “Boga”.

Godoy (1975) descreveu algumas características morfológicas da espécie *Leporinus elongatus*, destacando o corpo como alongado e relativamente alto, com dorso cinzento-esverdeado, às vezes apresentando três manchas arredondadas escuras no lado e, em geral, com sete faixas verticais escuras que vão da cabeça até o pedúnculo; a boca em posição

ântero-inferior; a cabeça longa e acarneirada, com o dorso cinzento-esverdeado; o olho com íris denegrida e com faixa vermelho-alaranjada na parte superior; as nadadeiras com padrões um pouco distintos de coloração, sendo no geral acinzentadas-azuladas, com as nadadeiras ventral e anal, ao contrário da peitoral, nitidamente amarelo-citrinas na parte distal, a caudal apresentando um faixa distal de um amarelo claro finamente orlada de cinzento e a adiposa cinzento-amarelada; e escamas do tipo ciclóides com marcas anuais (*annuli*) que assinalam migrações e desovas.

As “piaparas” são peixes de grande porte, podem ser citados como exemplo os maiores espécimes capturados por Godoy (1975) no rio Mogi Guassu, os quais foram uma fêmea de 78 cm de comprimento total (L_T) e 5.380 g de peso total (W_T) e um macho de 57 cm (L_T) e 1.920 g (W_T), com idades estimadas através de escamas de 12 – 14 anos e de 8 – 9 anos, para a fêmea e para o macho respectivamente; ou ainda um espécime de 51,7 cm (L_T) capturado por Vazzoler (1996) no alto rio Paraná.

L. elongatus são peixes migradores, cuja estratégia reprodutiva consiste em subir os rios maiores até locais com condições físicas e químicas adequadas para desova, e descer passivamente estes rios, alimentando-se, até próximo à foz, onde encontram rios adjacentes próximos e passam parte do ano, de fevereiro a agosto, até iniciarem novas migrações a partir de setembro, reproduzindo-se entre os meses de dezembro e janeiro (Godoy, 1975; Vazzoler, 1996). São citadas ainda por estes autores características reprodutivas de *L. elongatus* tais como: periodicidade sazonal, fecundação externa, desova do tipo total e ausência de cuidados parentais. Godoy (1975), analisando itens alimentares utilizados por *L. elongatus* no rio Mogi Guassu, descreveu a espécie como herbívora, insetívora, e eventualmente malacófaga e planctófaga; já Agostinho *et al.* (1997b), estudando a planície de inundação do alto rio Paraná, classificaram *L. elongatus* como uma espécie insetívora e Hahn *et al.* (1997), estudando esta mesma área, amostraram os principais recursos

alimentares utilizados, e constatou maior frequência de insetos (mais de 60%), vegetais superiores e detritos (ambos de 0 a 30%).

De acordo com Martins (2003), apesar de informações a respeito da diversidade genética de populações da espécie *L. elongatus* serem críticas para a sobrevivência e conservação desta espécie, não há disponibilidade de nenhuma informação desse tipo. Visto que *L. elongatus* representa um recurso pesqueiro ameaçado e uma espécie promissora para ser utilizada em aquicultura, a seleção cuidadosa dos estoques selvagens, baseados em critérios genéticos, pode oferecer um grande potencial para o sucesso de programas de recuperação e manutenção da espécie, além de dar suporte as atividades de aquicultura aumentando a produção.

1.1.5 BARRAGENS HIDROELÉTRICAS E ESCADAS PARA TRANSPOSIÇÃO DE PEIXES

No mundo a maioria dos grandes rios é fragmentada por barragens, e esta fragmentação altera os padrões de migração entre populações de peixes, pois converte rios de fluxo livre em reservatórios (JAGER *et al.*, 2001; NILSSON *et al.*, 2005). Os barramentos causam impactos nas características hidrológicas e, conseqüentemente, nos atributos físicos, químicos e biológicos dos sistemas naturais, constituindo a maior fonte pontual de interferência humana nos regimes hídricos naturais (AGOSTINHO, 1992).

Conforme Agostinho *et al.* (2002), a construção de barragens hidroelétricas no Brasil teve um grande impulso no início da década de 1960, sendo que os reservatórios formados são responsáveis por gerar cerca de 95% da energia elétrica brasileira. Estas barragens têm sido construídas em série, agravando grandemente os impactos nas populações de peixes migradores, já que interrompem as rotas migratórias, separando o ambiente de

desenvolvimento inicial, reprodutivo e de crescimento, respondendo diretamente pelo desaparecimento virtual de grandes espécies migradoras. Barragens também interferem no ciclo de vida dos organismos aquáticos e produzem alterações importantes nos ecossistemas ribeirinhos. Entre elas pode-se citar a mudança de ambiente lótico para lântico, que afeta os peixes de várias maneiras: interrompe rotas migratórias e elimina obstáculos naturais, importantes para a reprodução de espécies de peixes 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 (HILSDORF; PETRERE, 2002).

Foram realizadas tentativas de reduzir tais impactos e suas conseqüências aos estoques naturais de peixes (controle da atividade pesqueira e construção de estruturas que facilitem a passagem de peixes pela barragem), mas todas com consideráveis ambigüidades em seus princípios e operação (AGOSTINHO *et al.*, 2002).

Entre os mecanismos de mitigação dos impactos causados pelos barramentos citados acima estão as escadas para transposição de peixes. No Brasil, a construção desses empreendimentos é um requerimento legal que determina que “todo aquele que, por qualquer propósito, represar as águas de rios, córregos e riachos são obrigados a construir escadas que permitam a livre subida dos peixes”. A obrigatoriedade dessa ação resulta numa série de equívocos, pois sua efetividade é dependente de interações entre as características do mecanismo e a natureza da ictiofauna presente. Desta maneira, ao invés de contribuir para a manutenção das populações locais, é possível que estas passagens sejam responsáveis por impactos adicionais ao ambiente (AGOSTINHO *et al.*, 2002; HILSDORF; PETRERE, 2002; AGOSTINHO; GOMES; LATINI, 2004).

Agostinho *et al.* (2002), baseados em dados próprios e da literatura, analisaram a eficiência da transposição contra corrente dos peixes através das escadas de transposição, a continuidade da migração reprodutiva ao longo do reservatório, a migração rio abaixo da prole e a passagem desta prole através da barragem. Estes autores chegaram a conclusão de que as escadas de transposição, no início, foram construídas sem o conhecimento técnico e científico do empreendimento ou da biologia da ictiofauna presente no local de implantação das escadas de transposição. Destacam ainda que, apesar de conhecimentos escassos e incompletos, resultados publicados até o momento indicam que experiências com passagens para peixes na América do Sul, baseadas em modelos norte-americanos para salmonídeos, não foram proveitosas, resultando em desperdício de dinheiro, esforços e oportunidades de estudos. Por fim, tais autores concluem que há possibilidade que as escadas possam ter sido responsáveis por impactos adicionais aos estoques de peixes.

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

1.1.6 O RIO PARANAPANEMA E O COMPLEXO CANOAS

O rio Paranapanema (Figura 2) com suas nascentes na vertente ocidental da Serra de Paranapiacaba, no município de Capão Bonito, estado de São Paulo, é um importante afluente do rio Paraná, estando localizado na bacia do Alto Paraná. Estende-se por mais de 600 Km, com orientação leste-oeste, da nascente até sua foz com rio Paraná na divisa entre os municípios de Rosana/SP e Marilena/PR, dos quais por volta de 330 Km, a partir da foz do rio Itararé, dividem naturalmente os estados de São Paulo e do Paraná. Com seu leito principal e afluentes, o rio Paranapanema drena uma área aproximada de 109.600 Km² (DIAS, 2003; DUKE ENERGY, 2003). Um desnível aproximado de 500 metros e curso bastante acidentado fizeram com que houvesse interesse no aproveitamento deste rio na geração de energia hidroelétrica, o que teve início em 1958 com a construção da usina de Salto Grande, e hoje estão em operação 10 usinas hidroelétricas ao longo do rio Paranapanema (DUKE ENERGY, 2003), Figura 3.

O Complexo Canoas (Figuras 2 e 3) é 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 6 m (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 km², suas margens são compostas principalmente por pastagens e remanescentes de vegetação ciliar, apresenta ausência de lagoas marginais. Já o reservatório

da UHE Canoas II está localizado a montante do reservatório da UHE Canoas I, entre os municípios de Palmital (SP) e Andirá (PR), com águas lânticas, possui área de 22,5 km², suas margens também são ocupadas por pastagens, com escassos remanescentes de vegetação ciliar e ausência de lagoas marginais (DIAS,2003; DUKE ENERGY, 2003).

As usinas hidroelétricas que compõem o Complexo Canoas são as únicas no rio Paranapanema que receberam a implantação de escadas para transposição de peixes, as quais começaram a operar em novembro de 2000 (BRITTO;SIROL, 2005).

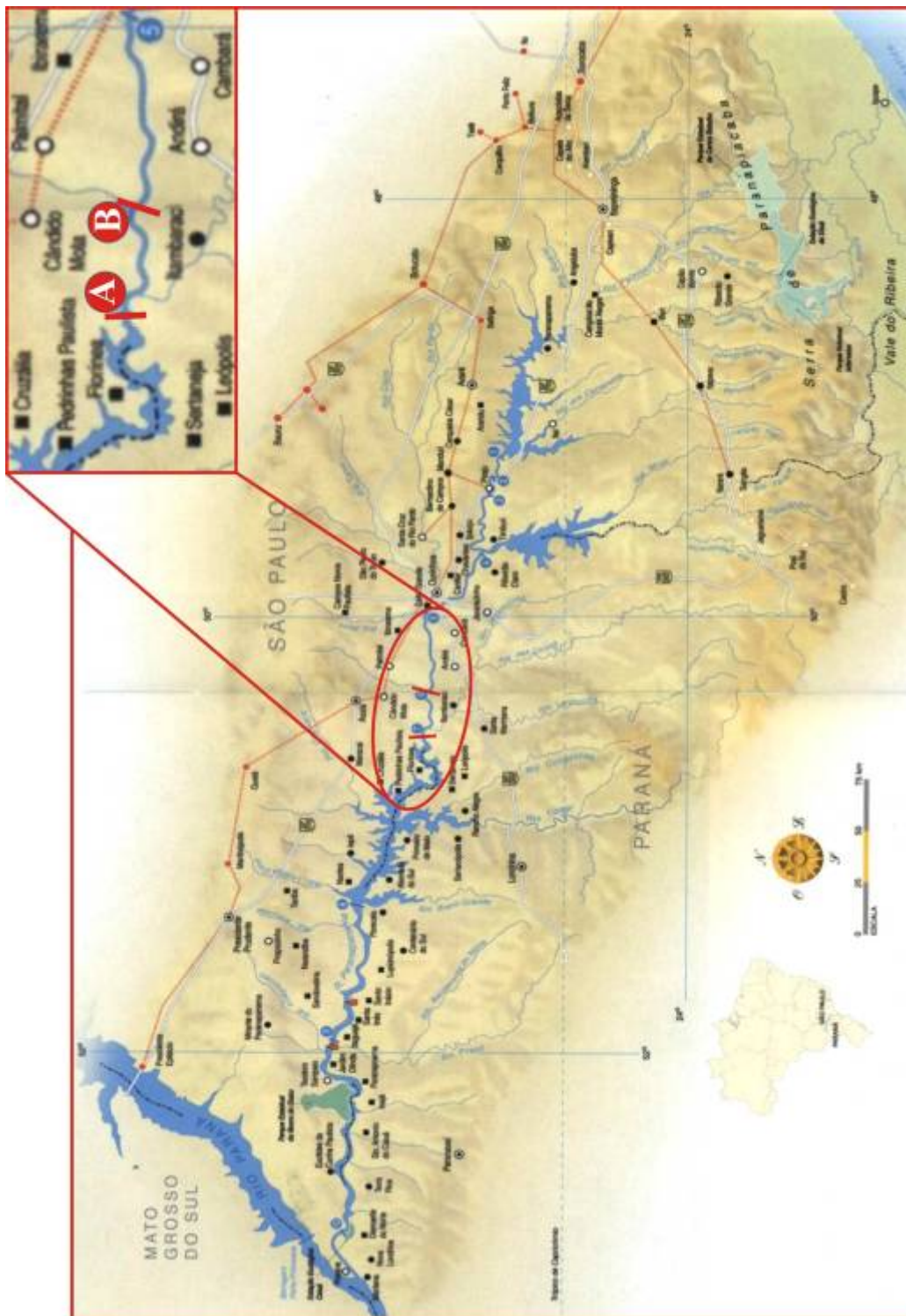


Figura 2: Mapa mostrando a drenagem do rio Paranapanema, da nascente a foz, destacando o Complexo Canoas em sua porção média. A → UHE Canoas I e B → UHE Canoas II.

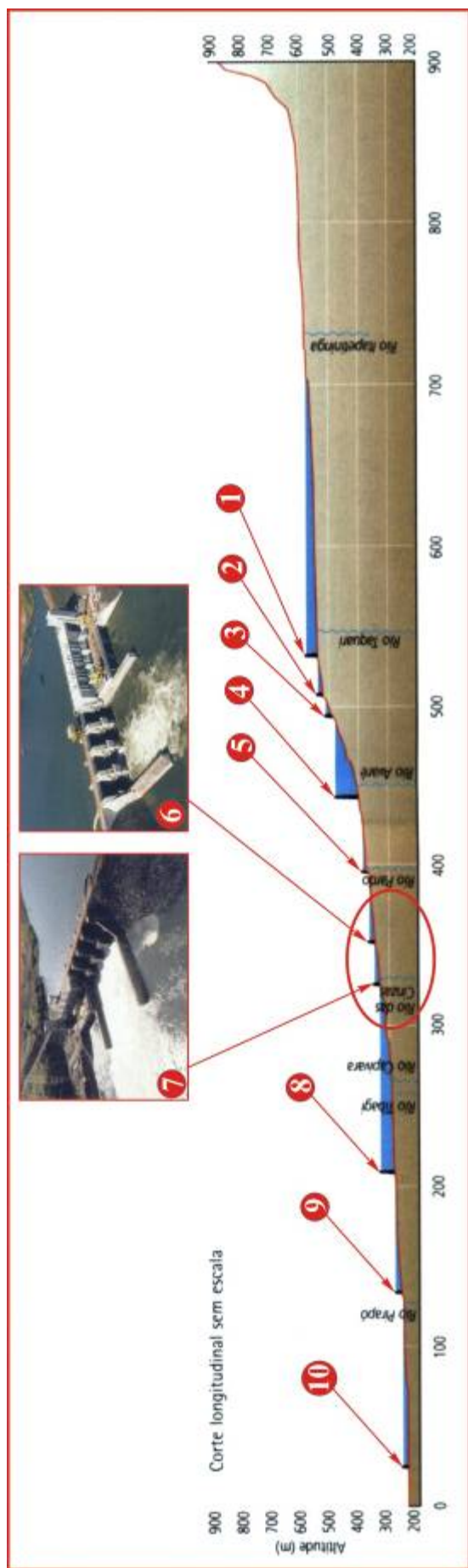


Figura 3: Corte transversal do rio Paranapanema com todas as usinas hidroelétricas presentes em seu curso (1 → UHE Jurumirim; 2 → UHE Piraju; 3 → UHE Paranapanema; 4 → UHE Chavantes; 5 → UHE Salto Grande; 6 → UHE Canoas II; 7 → UHE Canoas I; 8 → UHE Capivara; 9 → UHE Taquaruçu e 10 → UHE Rosana. Em destaque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

2. OBJETIVOS

Dentro do cenário descrito acima, a respeito das barragens hidroelétricas, mecanismos de transposição para peixes e espécies migradoras, surge o objetivo do presente trabalho: monitorar geneticamente a espécie *Leporinus elongatus* no Complexo Canoas no rio Paranapanema, através do uso dos marcadores RAPD e microssatélites.

Os seguintes objetivos específicos delinearão este trabalho:

- Analisar grupos de indivíduos capturados nas escadas de transposição das UHE Canoas I e II, durante diferentes piracemas, quantificando a variabilidade genética de cada grupo;
- Estimar parâmetros de diversidade genética para os grupos capturados na escada de transposição para peixes da UHE Canoas I durante diferentes piracemas e, da mesma forma para os capturados na UHE Canoas II;
- Comparar, através de parâmetros de diversidade genética, os grupos capturados na escada de transposição para peixes na UHE Canoas I com aqueles provenientes da UHE Canoas II, com a finalidade de verificar se os grupos amostrados pertencem a uma única população ou se são originados de populações geneticamente diferenciadas.

A obtenção desses dados sobre a estrutura populacional de *L. elongatus* será importante para o desenvolvimento de programas de manejo e conservação da espécie no Complexo Canoas.

Artigo

**Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no
Complexo Canoas – rio Paranapanema.**

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

Artigo

**Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no
Complexo Canoas – rio Paranapanema.**

Juliano Vilas Boas Ramos¹, Fernanda Simões de Almeida¹, Mário Luís Orsi², Sandro Geraldo de Castro Britto³, Leda Maria Koelblinger Sodré^{1*}.

¹ Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

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

³ 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. elongatus*

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

* 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 elongatus* no Complexo Canoas – rio Paranapanema – Brasil. Dez 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. elongatus* do Complexo Canoas estão estruturados como uma única população. Os dados obtidos sobre a diversidade genética e estrutura populacional de *L. elongatus* 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

A maioria dos grandes rios no mundo é fragmentada por barragens, e esta fragmentação altera os padrões de migração das populações de peixes, pois converte rios de fluxo livre em reservatórios (Jager *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2005). A interrupção de rotas migratórias dessas espécies, fragmentação de ambientes de desova, desenvolvimento inicial e crescimento, é em grande parte responsável pelo desaparecimento virtual de espécies migradoras de grande porte na porção alta da bacia do rio Paraná (Agostinho *et al.*, 2002; Agostinho e Gomes, 2005).

O rio Paranapanema tem a sua nascente na Serra de Paranapiacaba (Mata Atlântica), com orientação geral a noroeste e é um importante afluente da margem esquerda do rio Paraná (bacia do Alto Paraná). Nos últimos 50 anos este rio tem sofrido forte intervenção humana com a construção de 10 usinas hidroelétricas formando um sistema de reservatórios em cascata. As usinas hidroelétricas (UHE) de Canoas I e de Canoas II construídas em 1999, e seus respectivos reservatórios estão localizados no médio rio Paranapanema, formando o Complexo Canoas. Essas são as únicas UHEs nas quais foram construídas escadas para transposição de peixes, as quais têm intuito de minimizar o impacto do represamento na manutenção dos estoques naturais de peixes (Duke Energy, 2003; Britto e Sirol, 2005).

A construção de escadas para transposição de peixes em alguns reservatórios é uma das medidas mitigatórias empregadas por determinação de legislação federal brasileira. Embora não haja dúvidas sobre a habilidade de várias espécies migradoras ascender as escadas e alcançar o reservatório, a seletividade dessas escadas é consenso nos estudos realizados. Há indícios de que essas obras teriam eficiência duvidosa na preservação ou conservação dos estoques em um cenário de barragens em série (Borghetti *et al.*, 1994; Agostinho *et al.*, 2002; Agostinho e Gomes, 2005).

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

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

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

A espécie *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1850) pertence à ordem Characiformes, família Anostomidae, é distribuída somente na América do Sul, ocorrendo no Brasil nas bacias dos rios Paraná e São Francisco, onde é conhecida popularmente por “piapara”. Devido ao grande porte que apresentam e por empreenderem migrações reprodutivas anuais nessas bacias, indivíduos desta espécie são explorados tanto na pesca comercial como na de subsistência, constituindo-se em um importante item alimentar das populações ribeirinhas (Garavello e Britski, 2003).

No presente estudo marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites (SSR –*Simple Sequence Repeats*) foram utilizados para estimar o índice de variabilidade genética de grupos de *Leporinus elongatus* coletados nas escadas para transposição de peixes do Complexo Canoas, bem como para estimar parâmetros de diversidade genética com a finalidade de verificar se os grupos amostrados pertencem a uma única população ou se são originados de populações geneticamente diferenciadas. Com os dados obtidos espera-se contribuir para a compreensão da situação atual dessa espécie dentro do Complexo Canoas.

Material e Métodos

Material coletado

Dez grupos de *Leporinus elongatus* foram capturados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e UHE Canoas II (Figura 1), no período reprodutivo compreendido entre o início de 2003 e final de 2005: seis na escada de Canoas I e quatro na de Canoas II (Tabela 1). Foram utilizados para a captura dos exemplares tarrafas, peneiras e redes de arrasto.

Amostras de tecido muscular ou nadadeira adiposa foram retiradas dos espécimes e estocadas a -20°C até a utilização. Alguns exemplares do material estudado encontram-se depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina.

Tabela 1: Total de espécimes amostrados por grupo de *Leporinus elongatus* nas escadas para transposição de peixes das UHE Canoas I e II do Complexo Canoas – rio Paranapanema, para cada marcador utilizado.

Grupos	Canoas I		Canoas II	
	Marcadores		Marcadores	
	microsatélites	RAPD	microsatélites	RAPD
Início 2003	12	12	---	---
Final 2003	16	16	30	32
Início 2004	20	20	---	---
Final 2004	30	23	30	32
Início 2005	30	23	30	23
Final 2005	30	23	30	23
Total	138	117	120	110

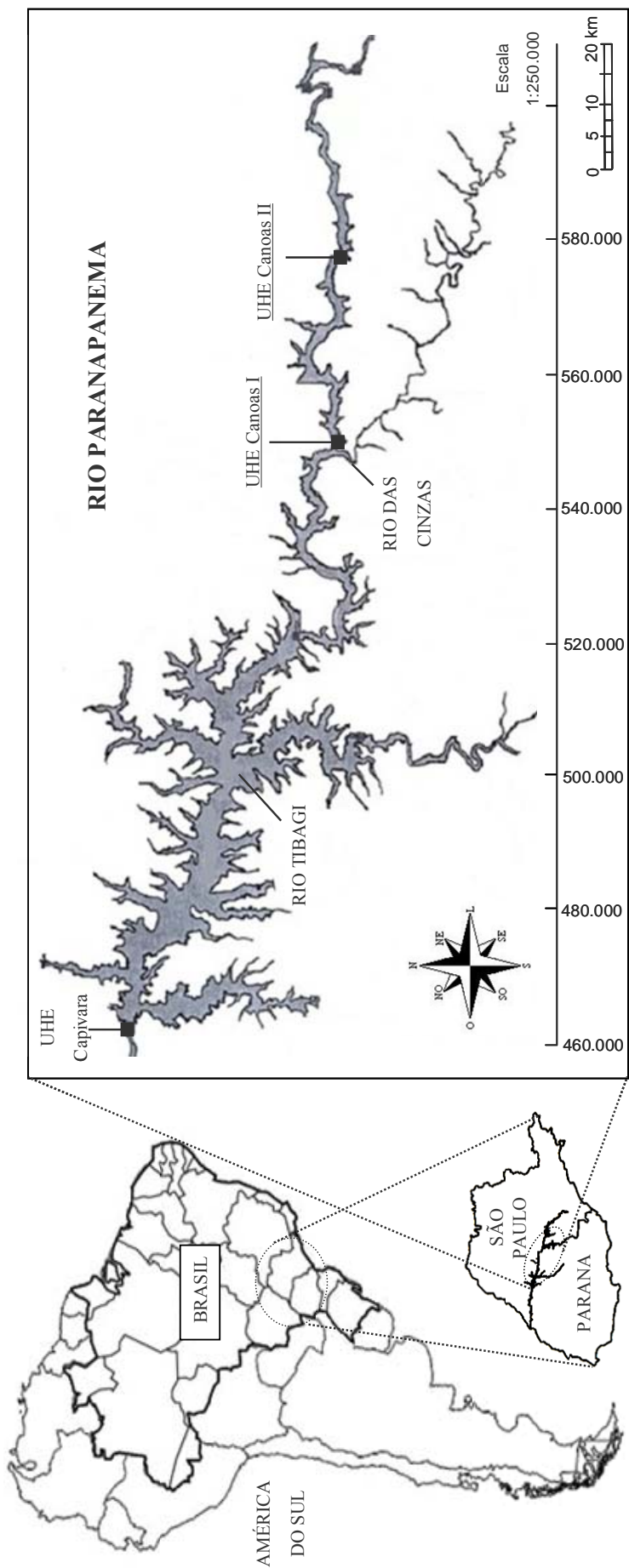


Figura 1: Visão parcial do Rio Paranapanema e seus principais afluentes (rios Tibagi e das Cinzas). Em destaque, os dois locais de coleta: UHE Canoas I e UHE Canoas II.

Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA genômico das amostras seguiu protocolo descrito por Almeida *et al.* (2001). A quantificação foi realizada em fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoeffer). O DNA das amostras foi ajustado a uma concentração de 5 ng/ μ L para uso nas reações de amplificação.

Amplificação do DNA

Marcadores RAPD

Os cinco *primers* (OPX 4; OPW 3, 9 e 19; OPAM 11) utilizados foram selecionados, com base na qualidade e quantidade de bandas geradas, a partir de quatro *kits* de oligonucleotídeos da Operon Technologies.

Cada reação de amplificação continha 3,3 μ l de água bidestilada; 1,5 μ l de tampão de reação 10x; 1,5 μ l de dNTPs (250 μ M); 5 μ l de MgCl₂ (3,3 mM); 2 μ l de *primer* (0,33 μ M) e 0,2 μ l de Taq DNA Polimerase (1 U), somando 13,5 μ l de solução, mais 1,5 μ L de DNA de cada amostra (0,5 ng/ μ L). 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 microsatélites

Morelli *et al.* (2007) isolaram e caracterizaram oito locos de microsatélites 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 elongatus*. 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 (acima citados) em *L. elongatus* coletados no Complexo Canoas sendo selecionados os *primers* para os locos Lmac 06, Lmac 08 e Lmac 09.

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 MgCl₂ (1,87 mM); 0,5 µl de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*) (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 seguiu os programas de acordo com o loco a ser amplificado, sendo um programa básico composto de uma 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 X°C (pareamento, a temperatura X depender do *primer* a ser utilizado) e 15 segundos a 72°C (extensão), com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. As Tabelas 2 e 3 mostram os pares de *primers* utilizados por loco, bem como as características desses locos.

Tabela 2: Sequências de nucleotídeos das repetições *motifs*, dos *primers* franqueadores e temperatura de anelamento (Ta) para os locos de microsatélite analisados para *Leporinus elongatus*.

Locos	Repetição <i>motif</i>	Seqüência dos <i>Primers</i> (5' - 3')	Ta (°C)
Lmac 06	(CA) _n	F: CTCTACTTCACTTTTACAGCAG R: CCCGAGCCGCGTCACACTTC	56
Lmac 08	(TC) _n	F: CCATTTCTGTCTTACCTTTG R:CTTCGGGAGTTGACAGCACC	55
Lmac 09	(AG) _n (GG)(AG) _n	F: TAAACAAACGGTGGGCAGTG R: TATCTTCACTAATCAAACCTCC	56

Análise Eletroforética

Marcadores RAPD

Ao DNA amplificado foi acrescentado tampão de amostra (glicerol 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 desejadas.

Marcadores microssatélites

Da mesma forma para os marcadores microssatélites, após amplificação do DNA, foi adicionado tampão de amostra (glicerol e azul de bromofenol) sendo este então submetido ao processo eletroforético. A eletroforese para as reações microssatélites foi feita 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 21V/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 genéticos em nível inter-populacional (diversidade e estrutura genética).

Para a realização das análises genéticas intra-populacionais, foram considerados os grupos de *L. elongatus* conforme Tabela 1. Inicialmente cada um dos 10 grupos foi avaliado individualmente quanto ao grau de variabilidade genética que apresentam. Posteriormente, os seis grupos da UHE Canoas I foram considerados como um único grupo (denominado CI) e da mesma forma os quatro da UHE Canoas II (denominado CII), sendo novamente estimado o índice de variabilidade genética.

Quando realizadas as análises genéticas inter-populacionais, inicialmente, os 10 grupos de *L. elongatus* foram comparados entre si, e em seguida, novamente foi considerado apenas dois grupos (CI e CII) para as comparações.

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 e Milligan, 1994).

A variabilidade genética dos diferentes grupos de *L. elongatus* foi estimada pela proporção dos locos polimórficos (\bar{P}), através do software TFPGA 1.3 (Miller, 1997), utilizando a correção de Lynch e Milligan (1994) e o critério de 95%.

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

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), refletindo a correlação da diversidade haplotípica em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. 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). Foi obtido também o F_{ST} por par de grupos amostrado através do método de distância que leva em conta o número de diferenças par a par dos haplótipos.

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 microsatélites

A partir do software ARLEQUIN 3.0, considerando o primeiro nível de análise proposto, foram utilizados os seguintes índices de diversidade molecular: (1) Número médio de diferenças par a par (π) (Tajima, 1983, 1993) – estimativa do número médio de

diferenças entre todos os pares de haplótipos na amostra; (2) Divergência gênica média por loco (Tajima, 1983; Nei, 1987) – a probabilidade de que dois alelos homólogos escolhidos ao acaso sejam diferentes. Também foi testado o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco em cada grupo através do “Teste Exato usando uma cadeia de Markov” (Guo e Thompson, 1992), obtendo também as heterozigosidades observadas e esperadas.

As estatísticas- F (Wright, 1951) são um conjunto de ferramentas que permitem dividir a deficiência de heterozigotos em componentes dentro e entre populações. O índice F_{IS} estima a deficiência de heterozigotos dentro de populações, o F_{ST} entre populações e F_{IT} o déficit global de heterozigotos. Dentro do segundo nível de análise (interpopulacional), o mesmo software citado acima foi utilizado para realizar o teste AMOVA. Esse teste foi capaz de fornecer estimativas dos componentes de variância e estatísticas análogas as F de Wright (1951). A significância dos componentes de variância e estatísticas- F foi testada da mesma forma que para os marcadores RAPD. Foi obtido também o F_{ST} por par de grupos amostrados através do método de distância por número de alelos diferentes.

Utilizando o software Fstat (Goudet, 2001) foram estimadas: (1) estatísticas análogas as F de Wright (1951): estatísticas de Nei (1987) e estatísticas de Weir e Cockerham (1984); (2) F_{ST} por par de grupos amostrados (cálculo do estimador multi-loco theta de Weir e Cockerham (1984), o qual é análogo ao F_{ST} entre todos os pares de amostras).

Dentro das estatísticas de Nei (1987), foram estimadas: H_o (proporção de heterozigotos observada), H_s (diversidade gênica dentro dos grupos amostrados), H_t (diversidade gênica total), D_{st} (diversidade gênica entre os grupos amostrados), G_{st} (análogo ao parâmetro F_{ST}) e G_{is} (denominação dada pelo autor do software – análogo ao parâmetro F_{IS}).

Através das estatísticas de Weir e Cockerham (1984) análogas as F de Wright (1951) foram estimadas: F (análogo ao F_{IT}), θ (análogo ao F_{ST}) e f (análogo ao F_{IS}).

Resultados

Marcadores RAPD

Os cinco *primers* utilizados nas análises produziram de 08 a 14 fragmentos, fornecendo um total de 57 locos para as análises genéticas.

Os valores estimados de variabilidade genética (\bar{P}) para os diferentes grupos de *L. elongatus* coletados nas escadas de transposição de Canoas I e II são apresentados na Tabela 3.

Entre os seis grupos provenientes de Canoas I, o “Final 2005” foi o que apresentou maior \bar{P} (80,70 %), em contraste com o grupo “Final 2003” que apresentou o menor \bar{P} (66,67 %). Quanto aos grupos de Canoas II, “Final 2005” apresentou maior \bar{P} (85,96 %) e “Final 2003” o menor ($\bar{P} = 77,19$ %). Entre todos os 10 grupos analisados o que apresentou o maior valor de \bar{P} foi o “Final 2005” de Canoas II. A análise considerando os grupos como CI e CII mostrou altos índices de locos polimórficos, 91,22% e 87,72% para CI e CII, respectivamente (Tabela 3).

Para a análise entre os 10 grupos de *L. elongatus* das escadas de Canoas I e Canoas II, os resultados de identidade (I) e distância (D) genética estão apresentados na Tabela 4. Esses resultados mostraram que entre os grupos da escada de Canoas I o maior valor de I (0,9825) foi encontrado entre os grupos “Início 2003-1” e “Final 2003-2”, os quais também apresentaram o menor valor de D (0,0176). Para os grupos amostrados de Canoas II, o maior valor de I (0,9561) encontrado foi entre os grupos “Final 2003-7” e “Final 2004-8”, os quais também apresentaram o menor valor de D (0,0449).

Quando comparados os 10 grupos entre si, o maior valor de I (0,9706) e menor valor de D (0,0298) foram encontrados entre os grupos “Início 2005-5” e “Final 2003-

7”]; sendo que o menor valor de I (0,9119) e maior valor de D (0,0922) foram encontrados entre os grupos “Início 2004-3” e “Final 2005-10” (Tabela 4).

O dendrograma de distância genética (Figura 2) é formado por dois agrupamentos com um índice de consistência de 100%. Um agrupamento é formado por 4 grupos de *L. elongatus* de Canoas I (“Início de 2003 -1”, “Final de 2003-2”, “Início de 2004 - 3” e “Final de 2004- 4) e o outro formado pelos dois grupos de Canoas I do ano de 2005 (5 e 6) e pelos quatro grupos de Canoas II (7-10). Esses agrupamentos estão de acordo com os valores de distância apresentados na Tabela 4.

Tabela 3: Proporção de locos polimórficos (\bar{P}) obtida com o marcador RAPD para os diferentes grupos de *Leporinus elongatus* capturados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

Grupos de Canoas I						
\bar{P}	Início 2003-1	Final 2003-2	Início 2004-3	Final 2004-4	Início 2005-5	Final 2005-6
	68,42 %	66,67 %	77,19 %	70,17 %	77,19 %	80,70 %
Grupos Canoas II						
\bar{P}	---	Final 2003-7	---	Final 2004-8	Início 2005-9	Final 2005-10
	---	77,19 %	---	80,70 %	78,95 %	85,96 %
Grupo CI – Canoas I						
\bar{P}	91,22 %					
Grupo CII – Canoas II						
\bar{P}	87,72 %					

Tabela 4: Identidade genética (diagonal superior) e Distância genética (diagonal inferior), obtidos com marcadores RAPD, para os grupos de *Leporinus elongatus* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 – 6) e Canoas II (7 – 10) – rio Paranapanema.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	*****	0,9825	0,9609	0,9695	0,9154	0,9458	0,9407	0,9181	0,9303	0,9279
2	0,0176	*****	0,9760	0,9743	0,9261	0,9397	0,9399	0,9216	0,9173	0,9205
3	0,0399	0,0243	*****	0,9523	0,9360	0,9393	0,9427	0,9192	0,9138	0,9119
4	0,0310	0,0260	0,0488	*****	0,9181	0,9372	0,9292	0,9292	0,9157	0,9232
5	0,0884	0,0768	0,0662	0,0855	*****	0,9404	0,9706	0,9471	0,9412	0,9438
6	0,0557	0,0622	0,0626	0,0649	0,0615	*****	0,9498	0,9284	0,9369	0,9532
7	0,0611	0,0620	0,0590	0,0734	0,0298	0,0516	*****	0,9561	0,9483	0,9500
8	0,0855	0,0816	0,0842	0,0734	0,0544	0,0743	0,0449	*****	0,9374	0,9445
9	0,0723	0,0863	0,0902	0,0881	0,0606	0,0652	0,0531	0,0646	*****	0,9462
10	0,0749	0,0829	0,0922	0,0800	0,0578	0,0480	0,0512	0,0571	0,0553	*****

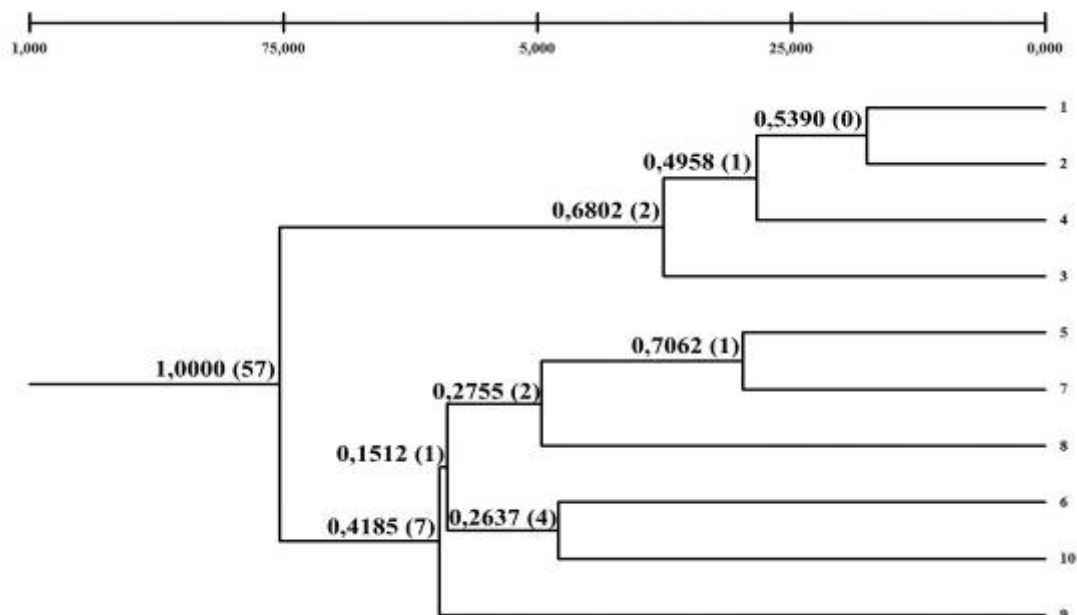


Figura 2: Dendrograma de distância genética, obtido com os marcadores RAPD, entre os 10 grupos de *Leporinus elongatus* provenientes das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 a 6) e Canoas II (7 a 10) - rio Paranapanema. Os números em cada um dos nós indicam os valores de consistência obtidos a partir do *bootstrapping* e os números dentro dos parênteses indicam o número de locos suportando cada nó.

Os resultados obtidos com a AMOVA indicaram, para todas as análises realizadas, que a maior fonte de variação está dentro dos grupos de *L. elongatus* amostrados e não entre eles (Tabela 5). Os valores de F_{ST} obtidos indicaram, segundo os critérios propostos por Wright (1978), uma diferenciação genética moderada entre os grupos amostrados de Canoas I ($F_{ST} = 0,095$); entre os de Canoas II ($F_{ST} = 0,106$) e entre os grupos CI e CII ($F_{ST} = 0,101$), (Tabela 5).

O cálculo do F_{ST} par a par, mostrou que a maior diferenciação ocorre entre os grupos “Final 2003-2” e “Início 2005-5” ($F_{ST} = 0,137$) e a menor entre “Início 2003-1” e “Final 2004-4” ($F_{ST} = 0,032$), para as comparações entre os grupos de Canoas I. Nas comparações entre os grupos de Canoas II, “Final 2004- 8” e “Início 2005-9” apresentaram a maior diversidade ($F_{ST} = 0,145$), enquanto os de “Final 2003-7” e “Início 2005-9” a menor ($F_{ST} = 0,078$). Quando comparados entre si os 10 grupos amostrados, foi encontrada a maior

diferenciação entre os de “Final 2003-2” e “Final 2005- 10” ($F_{ST} = 0,164$) e a menor entre os “Início 2005-5” e “Final 2003-7” ($F_{ST} = 0,037$) (Tabela 6).

Tabela 5: Análise da variância molecular (AMOVA), obtida com os marcadores RAPD, entre os grupos de *Leporinus elongatus* capturados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

Grupos	F. V.	G. L.	S. Q.	C. V.	P. V.	F_{ST}
Canoas I	Entre os grupos	5	89,934	0,624*	9,53	0,095*
	Dentro de Grupos	111	658,05	5,928	90,47	
	Total	116	747,98	6,552		
Canoas II	Entre os grupos	3	103,53	0,966*	10,58	0,106*
	Dentro de Grupos	106	866,13	8,171	89,42	
	Total	109	969,65	9,137		
CI x CII	Entre os grupos	8	220,94	0,882*	10,14	0,101*
	Dentro de Grupos	195	1523,19	7,811	89,86	
	Total	203	1744,13	8,693		

* valores significativos a 5% de probabilidade com 10.000 permutações.

F. V.: fonte de variação; G. L.: graus de liberdade; S. Q.: soma de quadrados;

C. V.: componentes de variação; P. V.: porcentagem de variação.

Tabela 6: F_{ST} por par de grupos, obtido com os marcadores RAPD, para os grupos de *Leporinus elongatus* capturados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 – 6) e Canoas II (7 – 10) – rio Paranapanema.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0									
2	0,032*	0								
3	0,046*	0,038*	0							
4	0,068*	0,043*	0,073*	0						
5	0,121*	0,137*	0,088*	0,126*	0					
6	0,075*	0,093*	0,093*	0,092*	0,103*	0				
7	0,060*	0,099*	0,068*	0,100*	0,037*	0,090*	0			
8	0,133*	0,145*	0,140*	0,135*	0,097*	0,122*	0,010*	0		
9	0,105*	0,162*	0,117*	0,148*	0,095*	0,111*	0,078*	0,145*	0	
10	0,095*	0,164*	0,157*	0,148*	0,104*	0,093*	0,099*	0,110*	0,107*	0

* valores significativos a 5% probabilidade com 10.000 permutações.

Marcadores microsatélites

Os resultados referentes ao número de alelos obtidos e o peso molecular aproximado para os três locos de microsatélites analisados nos 10 grupos de *L. elongatus* são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Locos de microsatélite analisados, número de alelos obtidos por loco e peso molecular do maior e do menor alelo de cada loco, para *L. elongatus*.

Locos	Número de alelos	Pesos moleculares dos alelos
Lmac 06	20	< 107 pb > 142 pb
Lmac 08	38	< 184 pb > 291 pb
Lmac 09	21	< 173 pb > 192 pb

Para os seis grupos de *L. elongatus* da escada para transposição de peixes de Canoas I (Tabela 1), essas análises mostraram que no geral, o grupo “Final 2005-5” foi o que apresentou os maiores índices de diversidade molecular, com um total de 54 haplótipos amostrados, com um número médio de diferenças entre pares de haplótipos (π) = 2,76 (\pm 1,48) e uma divergência média por loco de 0,92 (\pm 0,55). O grupo “Início 2003-1” foi o que apresentou o menor número de haplótipos (23), no entanto, o grupo “Final 2004-4” foi o que apresentou os menores valores para π = 2,55 (\pm 1,39) e de divergência média por loco (0,85 \pm 0,51). A maior heterozigosidade média observada (\bar{H}_o) foi encontrada no grupo “Final de 2003- 2” (0,67) e a menor \bar{H}_o (0,48) no grupo “Final 2004- 4” (Tabela 8).

Para os quatro grupos de *L. elongatus* amostrados na escada de Canoas II (Tabela 1), o grupo “Final 2003- 7” com 57 haplótipos amostrados, apresentou os maiores valores de diversidade molecular (2,64 \pm 1,43) e π = 0,88 (\pm 0,53). O grupo “Início de 2005 – 9” apresentou o menor número de haplótipos (51), mas foi o grupo “Final 2005-10” que

apresentou os menores índices de número médio de diferenças entre pares de haplótipos – 2,53 ($\pm 1,38$) e de divergência média por loco = 0,84 ($\pm 0,51$). A maior \bar{H}_o (0,69) foi encontrada no grupo “Final de 2003- 7” e a menor \bar{H}_o (0,50) no grupo “Final 2004-8” (Tabela 8).

Quando considerados apenas dois grupos maiores de *L. elongatus* (CI e CII), a maior diversidade molecular é encontrada em CI que apresentou 251 haplótipos, $\pi = 2,64$ ($\pm 1,46$) e 0,88 ($\pm 0,53$) de divergência gênica média por loco. No entanto ambos os grupos (CI e CII) apresentam valores de \bar{H}_o bastante próximos (0,58 e 0,59) (Tabela 8).

Os resultados dos testes para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, para cada loco em cada um dos 10 grupos, mostraram que três locos de microssatélite investigados apresentaram desvios significantes das frequências esperadas pelo equilíbrio genético ($P < 0,05$), o que é corroborado pelas diferenças nos valores obtidos de \bar{H}_o e \bar{H}_e apresentados na Tabela 8.

O resultado da análise de F_{ST} par a par entre os grupos de *L. elongatus*, apresentado na Tabela 9. Para os seis grupos de Canoas I a maior diferenciação genética foi entre os grupos “Final 2004- 4” e “Início 2005-5” ($F_{ST} = 0,077$) e a menor entre os grupos “Início 2003-1” e “Final 2004- 4” ($F_{ST} = 0,008$). Entre os grupos de Canoas II, “Final 2004- 8” e “Final 2005-10” foram os que apresentaram a maior diferenciação ($F_{ST} = 0,04$) enquanto os “Início 2005- 9” e “Final 2005- 10” a menor ($F_{ST} = 0,003$). Quando comparados os 10 grupos entre si, a maior diferenciação ocorre entre os grupos “Final 2004-4 CI” e “Final 2004- 8 CII” ($F_{ST} = 0,107$) e a menor entre os grupos “Final 2003-2 CI” e “Final 2005-10 CII” ($F_{ST} = 0,010$).

Tabela 8: Total de haplótipos (T.H.), número médio de diferenças entre pares de haplótipos (π), divergência gênica média por loco (D.G.M.), heterozigosidade média observada (\bar{H}_o) e heterozigosidade média esperada (\bar{H}_e), obtidos com os marcadores microssatélites, para os grupos de *Leporinus elongatus* amostrados nas escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 – 6) e Canoas II (7 – 10) – rio Paranapanema.

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CI	CII
T.H.	23	32	38	52	59	54	57	52	51	55	251	203
π	2,58 (1,43)	2,66 (1,45)	2,72 (1,47)	2,55 (1,39)	2,71 (1,46)	2,76 (1,48)	2,64 (1,43)	2,56 (1,39)	2,60 (1,41)	2,53 (1,38)	2,74 (1,46)	2,64 (1,42)
D.G.M.	0,86 (0,53)	0,89 (0,54)	0,91 (0,55)	0,85 (0,51)	0,90 (0,54)	0,92 (0,55)	0,88 (0,53)	0,85 (0,51)	0,87 (0,22)	0,84 (0,51)	0,91 (0,54)	0,88 (0,52)
\bar{H}_o	0,61	0,67	0,52	0,48	0,64	0,60	0,69	0,50	0,56	0,63	0,58	0,59
\bar{H}_e	0,87	0,90	0,93	0,86	0,91	0,93	0,88	0,87	0,88	0,85	0,92	0,88

Tabela 9: F_{ST} par a par entre os grupos de *Leporinus elongatus* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I (1 – 6) e Canoas II (7 – 10) – rio Paranapanema, obtidos com os marcadores microssatélites.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0									
2	0,041*	0								
3	0,024*	0,028*	0							
4	0,008	0,044*	0,039*	0						
5	0,057*	0,060*	0,045*	0,077*	0					
6	0,031*	0,054*	0,047*	0,049*	0,026	0				
7	0,066*	0,057*	0,059*	0,096*	0,059*	0,045*	0			
8	0,074*	0,065*	0,076*	0,107*	0,069*	0,062*	0,036*	0		
9	0,016*	0,057*	0,034*	0,047*	0,029*	0,022	0,033*	0,034*	0	
10	0,010	0,043*	0,017	0,028*	0,028	0,012	0,038*	0,039*	0,003	0

* valores significativos a 5% probabilidade com 10.000 permutações.

A AMOVA realizada entre os seis grupos de *L. elongatus* de Canoas I, mostrou que a maior diversidade haplotípica encontra-se dentro dos indivíduos (62,96 %) e que a menor entre os grupos amostrados (2,56 %). O índice de fixação F_{ST} (0,026) mostrou que apesar da diferenciação genética entre os grupos ser pequena, ela é estatisticamente significativa. O índice de fixação F_{IS} mostrou um considerável grau de endogamia entre os indivíduos dentro de cada grupo ($F_{IS} = 0,354$) (Tabela 10).

Para os quatro grupos coletados em Canoas II a AMOVA mostrou, também, que a maior diversidade haplotípica encontra-se dentro dos indivíduos (66,92 %) e que a menor entre os grupos de *L. elongatus* (2,57 %). Apesar da diferenciação genética entre os grupos ser baixa, o índice de fixação F_{ST} (0,026) mostrou esta é estatisticamente significativa. Um alto grau de endogamia entre os indivíduos dentro de cada grupo foi evidenciado pelo índice de fixação $F_{IS} = 0,313$ (Tabela 10).

Quando considerados os dois grandes grupos CI e CII, a AMOVA mostrou a existência de uma baixa, porém significativa diferenciação genética ($F_{ST} = 0,026$). Como nos dois casos anteriores o índice endogamia ($F_{IS} = 0,349$) entre os indivíduos dentro de cada grupo foi considerável (Tabela 10).

As estatísticas de Nei (1987) forneceram um índice de heterozigosidade observada para cada loco e um índice total de heterozigosidade observada reunindo todos os seis grupos de *L. elongatus* de Canoas I (Tabela 11). O loco com maior heterozigosidade foi o loco Lmac 08 ($H_o = 0,741$), e o valor estimado para a H_o total (0,591) foi semelhante àqueles obtidos para \bar{H}_o de cada um dos seis grupos provenientes de Canoas I (Tabela 8).

Ainda para esses seis grupos de *L. elongatus* de Canoas I, os índices de diversidade genética de Nei (1987) mostraram alta diversidade gênica dentro dos grupos ($H_s = 0,889$) e uma pequena quantidade de diversidade gênica entre os grupos ($D_{st} = 0,025$). Estimadores de diversidade genética análogos aqueles das estatísticas- F (Tabela 9) foram obtidos pelas estatísticas de Nei (1987). Estes mostraram também um considerável índice de endogamia nos grupos amostrados ($G_{is} = 0,336$) e um valor baixo de diversidade entre esses grupos ($G_{st} = 0,027$) (Tabela 11).

Tabela 10: Análise da variância molecular (AMOVA), obtida com os marcadores microssatélites, entre os grupos de *Leporinus elongatus* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

Grupos	F. V.	G. L.	S. Q.	C. V.	P. V.	I. F.
Canoas I	Entre os grupos	5	17,08	0,035*	2,56	F_{ST} 0,026*
	Entre indivíduos dentro dos grupos	132	240,51	0,476*	34,48	F_{IS} 0,354*
	Dentro de indivíduos	138	120,00	0,869*	62,96	F_{IT} 0,370*
	Total	275	377,59	1,381		
Canoas II	Entre os grupos	3	11,27	0,034*	2,57	F_{ST} 0,026*
	Entre indivíduos dentro dos grupos	116	197,75	0,406*	30,51	F_{IS} 0,313*
	Dentro de indivíduos	120	107,00	0,892*	66,92	F_{IT} 0,331*
	Total	239	316,02	133,24		
CI x CII	Entre os grupos	1	11,04	0,036*	2,59	F_{ST} 0,026*
	Entre indivíduos dentro dos grupos	256	466,60	0,471*	33,98	F_{IS} 0,349*
	Dentro de indivíduos	258	227,00	0,880*	63,43	F_{IT} 0,366*
	Total	515	704,64	138,72		

* valores significativos a 5% de probabilidade com 10.000 permutações.

F. V.: fonte de variação; G. L.: graus de liberdade; S. Q.: soma de quadrados; I.F.: índice de fixação;

C. V.: componentes de variação; P. V.: porcentagem de variação.

Com relação aos quatro grupos de *L. elongatus* de Canoas II (Tabela 11) o loco Lmac 08 apresentou a maior heterozigosidade ($H_o = 0,74$), e o índice de heterozigosidade observada total (0,626), também foi semelhante aos valores de \bar{H}_o estimados individualmente para esses mesmos grupos conforme apresentado na Tabela 8. Os índices de diversidade, mostraram alta diversidade gênica dentro dos grupos ($H_s = 0,857$) uma pequena quantidade de diversidade gênica entre os grupo ($D_{st} = 0,016$). Essa análise também mostrou um alto índice de endogamia nos quatro grupos ($G_{is} = 0,269$) e um valor baixo de diversidade entre os grupos amostrados ($G_{st} = 0,018$) (Tabela 11).

Quando as estatísticas de Nei (1987) são aplicadas para a comparação entre os dois grupos de *L. elongatus* CI x CII, os resultados são concordantes com aqueles

apresentados para as comparações entre os seis grupos de Canoas I e os quatro de Canoas II, (Tabela 11).

Tabela 11: Estatísticas de Nei (1987) estimadas através dos locos microssatélites para os grupos de *Leporinus elongatus* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

Grupos	Loco	H _o	H _s	H _t	D _{st}	G _{st}	G _{is}
Canoas I	Lmac 06	0,670	0,894	0,901	0,006	0,007	0,251
	Lmac 08	0,741	0,954	0,961	0,007	0,007	0,223
	Lmac 09	0,361	0,819	0,881	0,061	0,070	0,560
	Total	<i>0,591</i>	<i>0,889</i>	<i>0,914</i>	<i>0,025</i>	<i>0,027</i>	<i>0,336</i>
Canoas II	Lmac 06	0,697	0,789	0,791	0,003	0,004	0,116
	Lmac 08	0,74	0,952	0,959	0,007	0,007	0,223
	Lmac 09	0,442	0,83	0,868	0,038	0,044	0,467
	Total	0,626	0,857	0,873	0,016	0,018	0,269
CI x CII	Lmac 06	0,685	0,847	0,879	0,032	0,036	0,191
	Lmac 08	0,737	0,961	0,961	0	0	0,233
	Lmac 09	0,413	0,873	0,879	0,007	0,007	0,527
	Total	0,612	0,894	0,906	0,013	0,014	0,315

H_o = proporção de heterozigotos observados; H_s = diversidade gênica dentro dos grupos;

H_t = diversidade gênica total;

D_{st} = quantidade de diversidade gênica entre os grupos;

G_{st} = análogo ao parâmetro F_{ST};

G_{is} = análogo ao parâmetro F_{IS}.

As estatísticas de Weir e Cockerham (1984) realizadas para as comparações entre os grupos de *L. elongatus* da escada de transposição de Canoas I, entre aqueles de Canoas II e entre os dois grandes grupos CI e CII mostraram valores semelhantes aos das estatísticas anteriores apresentadas (Tabela 12).

Tabela 12: Estatísticas de Weir e Cockerham (1984) estimadas para os locos de microssatélite nos grupos de *Leporinus elongatus* das escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema.

Grupos	Locos	F	θ	f
Canoas I	Lmac 06	0,257	0,009	0,251
	Lmac 08	0,233	0,008	0,227
	Lmac 09	0,575	0,074	0,541
	Total	0,351	0,030	0,331
Canoas II	Lmac 06	0,117	0,005	0,113
	Lmac 08	0,236	0,009	0,229
	Lmac 09	0,491	0,057	0,460
	Total	0,285	0,024	0,268
CI x CII	Lmac 06	0,253	0,07	0,197
	Lmac 08	0,233	0	0,233
	Lmac 09	0,537	0,015	0,53
	Total	0,337	0,028	0,318

F: análogo ao parâmetro F_{IT};

θ: análogo ao parâmetro F_{ST};

f: análogo ao parâmetro F_{IS}.

DISCUSSÃO

Lowe *et al.* (2004) argumentam que há três elementos principais compondo a variabilidade genética de uma espécie: (1) a *diversidade genética*, a qual representa a quantidade de variação genética que uma espécie ou grupo de organismos possuem; (2) a *diferenciação genética*, que mostra como a variação genética esta distribuída entre as populações; e (3) a *distância genética*, a qual quantifica a variação genética existente entre pares de populações.

Determinados processos genéticos são responsáveis por introduzir variação genética nas populações, ou ainda reorganizar a já existente, tanto dentro dos genomas quanto entre populações. A principal fonte de variação genética é a mutação, a qual é definida como qualquer mudança herdável no material genético. A recombinação e os elementos transponíveis têm a capacidade de reorganizar essa variação genética, enquanto a migração (fluxo gênico), a de espalhá-la (Hartl e Clark, 1997).

Marcadores moleculares hiper-variáveis como RAPD e microssatélites são úteis nos estudos que visam estimar a variabilidade e a estrutura populacional de uma espécie. No entanto, conforme Oliveira *et al.* (2006), a utilização de microssatélites tem encontrado barreiras devido ao alto custo no desenvolvimento de *primers* específicos. Contudo vários estudos têm mostrado que pares de *primers* determinados para uma espécie podem ser utilizados para outras espécies do mesmo gênero ou para gêneros diferentes da mesma família, esse atributo dos microssatélites é conhecido como transferabilidade ou amplificação espécie-cruzada. Considerando a propriedade da transferabilidade, foram utilizados no presente estudo *primers* construídos para *Leporinus macrocephalus* por Morelli *et al.* (2007). Para tanto, foram necessárias adequações das condições ideais de amplificação, bem como nas de análise eletroforética para o estudo da espécie *Leporinus elongatus*.

Ambos os marcadores, RAPD e microssatélites, utilizados neste estudo evidenciaram altos índices de diversidade genética para os 10 grupos de *Leporinus elongatus* provenientes do Complexo Canoas. Com os marcadores RAPD foram encontrados valores de \bar{P} (proporção de locos polimórficos) ao redor de 70 % (Tabela 3). O número de diferenças encontradas entre os pares de haplótipos microssatélites (π) mostrou-se alta (em média 2,69), evidenciando elevados valores de divergência média por loco (0,89 em média) (Tabela 8).

DeWoody e Avise (2000) observaram que os níveis médios de variação genética em locos microssatélites para peixes de água doce foram similares àqueles correspondentes para outros grupos de animais que não peixes. No entanto peixes marinhos apresentaram níveis significativamente mais altos de variação genética. Populações analisadas de peixes anádromos (ex: salmão) geralmente apresentaram valores intermediários entre populações de espécies marinhas e de água doce. Esses autores observaram que há uma tendência de aumento nos níveis de variação genética na medida em que se caminha de peixes de água doce para anádromos e deste para marinhos.

Ainda de acordo com esses mesmos autores, suspeita-se que a inclinação para uma maior variação genética em populações de peixes marinhos em comparação aquelas de água doce, pode refletir os tamanhos populacionais efetivos, em média maiores, das espécies de peixes marinhos, 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 entre outras da mesma espécie em áreas muito maiores. Com respeito ao nível esperado de variação genética, uma população local no ambiente marinho provavelmente estende-se por uma área muito maior e inclui muito mais indivíduos em um senso temporal do que uma típica de peixes de água doce limitada a um lago particular ou drenagem de rio por

longos períodos de tempo. 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 (como aquelas mediadas por efeitos glaciais do Pleistoceno) ou outras formas de redução da variação por seleção.

Para os grupos de *Leporinus elongatus* amostrados em Canoas I e Canoas II, o número de alelos observados por loco microssatélite variou de 20 a 38, com uma média de 26,4 alelos. A heterozigosidade observada variou de 0,361 a 0,741, com um valor médio de 0,60 (Tabela 8). Apesar dessa ser uma espécie migradora potamódroma (migra só em água doce), os valores encontrados estão dentro da variação das estimativas observadas para outras espécies de peixes de água doce no geral, e para aquelas migradores anádromas, conforme observado por DeWoody e Avise (2000). Vários cenários foram propostos para explicar a manutenção de uma alta diversidade haplotípica dentro de populações, incluindo grande tamanho populacional, heterogeneidade ambiental e características intrínsecas a história de vida da espécie que favorecem o rápido crescimento populacional (Nei, 1987).

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 a 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 intermediários às estimadas para microssatélites e para isoenzimas (10^{-6} a 10^{-9} por loco por geração) (Lougheed *et al.*, 2000). Resguardando as características particulares de cada marcador, as comparações da diversidade genética encontrada aqui para *L. elongatus* com aquela encontrada em outras espécies de peixes, podem ser realizadas.

Utilizando marcadores isoenzimáticos Revaldaves *et al.* (1997), em estudos com *Prochilodus lineatus* provenientes do rio Paraná, encontraram valores de \bar{P} em torno de 30%. Chiari e Sodré (1999) investigando a diversidade genética em cinco espécies de Anostomidae coletados no rio Tibagi, entre elas *L. elongatus*, utilizando sistemas isoenzimáticos, verificaram que *L. elongatus* apresenta uma das maiores diversidades genéticas (menor apenas que *L. friderici*) com $\bar{P} = 27,8 \%$ e $\bar{H}_o = 0,075$. Ambos os trabalhos citados mostraram valores de diversidade genética bem menores que os aqui vistos para *L. elongatus* com os marcadores RAPD e microssatélites. Segundo Vandewoestijne e Baguette (2002), essa diferença é explicada pela detecção de taxas mais altas de mutações e menor grau de pressão seletiva inerentes aos marcadores RAPD quando comparados aos locos isoenzimáticos, visto que os marcadores RAPD podem evidenciar variações em regiões codificantes e em não codificantes. Esse mesmo argumento pode ser utilizado para os marcadores microssatélites.

Chiari e Sodré (2001), utilizando marcadores RAPD, analisaram oito espécies de peixes da família Anostomidae do rio Tibagi e encontraram para *L. elongatus* valores de \bar{P} (58,7 %) próximos aos aqui mostrados. Martins *et al.* (2003) estudaram seis populações dessa mesma espécie, de diferentes rios da bacia do rio Paraná. Utilizando marcadores mitocondriais esses pesquisadores encontraram altos índices de diversidade genética nas populações desta espécie, quando comparados aqueles de outras espécies de peixes avaliadas com esse mesmo tipo de marcador.

Comparações dos resultados obtidos para os grupos de *Leporinus elongatus* com estudos de outras espécies migradoras do Complexo Canoas, mostraram que esta espécie possui níveis de diversidade genética comparáveis aos de *Prochilodus lineatus*, também realizados com RAPD e microssatélites ($\bar{P} \cong 74\%$; e $\bar{H}_o \cong 0,66$) (Paula, 2006), maiores do que os obtidos com *Leporinus friderici* ($\bar{P} \cong 62,5\%$; Ashikaga, 2005), com *Salminus*

brasiliensis ($\bar{P} \cong 42\%$; Lopes, 2005) e com *Schizodon nasutus* ($\bar{P} \cong 60\%$; Tsuchiya, 2006).

Este grau de variabilidade genética encontrada para *L. elongatus* é de suma importância para essa espécie, pois a presença de variações herdáveis a torna hábil em responder a seleção, isto é, se a variação genética estiver presente dentro de uma espécie, qualquer alteração nas pressões seletivas devido a mudanças ambientais permitirá que alguns indivíduos sobrevivam e se reproduzam (Lowe *et al.*, 2004).

Os marcadores microssatélites evidenciaram, apesar dos altos índices de diversidade genética encontrados, um desequilíbrio na quantidade de heterozigotos observada em relação à esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo observado menos heterozigotos do que o esperado (Tabela 8). Outro fato constatado no presente estudo, através desses marcadores, foram os níveis consideráveis de endogamia (F_{IS} , G_{IS} e f) dentro dos grupos (Tabelas 10, 11 e 12).

Markert *et al.* (2004) observaram que uma redução na heterozigosidade pode ser um efeito nocivo causado pela perda da diversidade alélica, ou seja, apesar da existência de um número grande de alelos (diversidade genética), poucos são aqueles que estão em alta frequência na população. Essa perda também seria responsável pela diminuição da taxa reprodutiva e de sobrevivência. Em longo prazo a consequência desse evento para a população seria a perda da capacidade em se adaptar a mudanças nas condições ambientais. Populações de peixes, no geral, formam metapopulações compostas por unidades reprodutivas distintas (Hansen e Loeschcke, 1994). Normalmente assume-se que indivíduos (ou populações) com reduzida heterozigosidade são mais endocruzados que aqueles com alta (Markert *et al.*, 2004). Estudos recentes mostraram que depressão por endocruzamento pode afetar as taxas demográficas de uma população e aumentar a probabilidade de extinção. Em muitos casos, no entanto, as mudanças nas taxas demográficas que regem o declínio

populacional têm origem não genética, como degradação do hábitat ou mortalidade causada pelo homem (Miller, 2003; Laroche e Durand, 2004).

Os dados encontrados para a espécie *L. elongatus* no Complexo Canoas, relativos à quantidade de heterozigotos observada e aos índices de endocruzamento, evidenciam que apesar da grande diversidade genética, esta espécie está perdendo sua diversidade alélica. Além disso, mostram que os grupos amostrados ao longo dos anos tornam-se cada vez mais endocruzados. Esses resultados alertam para o fato de que essa espécie vem sofrendo reduções em suas taxas demográficas e que em longo prazo corre sério risco de desaparecer do Complexo Canoas, com conseqüências semelhantes às populações existentes na represa Capivara, a jusante desse Complexo.

O teste AMOVA realizado com os diferentes grupos de *Leporinus elongatus* provenientes das escadas para transposição de peixes de Canoas I e II (Tabelas 5 e 10), e com ambos os marcadores, mostrou que a maior fonte de variação genética encontra-se nos indivíduos dentro dos grupos e não entre os grupos. Segundo Hartl e Clarck (1997), de forma natural, muitos organismos agregam-se de diferentes maneiras dentro de uma população. Ambientes naturais geralmente são fragmentados em áreas favoráveis e desfavoráveis, sendo que ao longo do tempo mesmo áreas uniformemente favoráveis podem ser fragmentas por diferentes ameaças naturais ou antrópicas. Esse cenário descrito faz com que a estruturação populacional seja quase universal entre os organismos, ou seja, grupos de indivíduos formando uma população podem apresentar diferenças genéticas, as quais consistem em nada mais do que a aquisição de freqüências alélicas diferentes por esses grupos ao longo do tempo.

O índice de fixação F_{ST} serve como uma medida conveniente e amplamente utilizada das diferenças genéticas entre subpopulações. A identificação das causas determinantes de um dado valor de F_{ST} observado em uma população natural é

freqüentemente difícil; freqüências alélicas entre subpopulações podem se tornar diferentes devido a processos aleatórios bem como por seleção natural (Hartl e Clark, 1997). Portanto, a diferenciação genética populacional pode ser dirigida por fatores ecológicos, evolutivos e históricos (Hatanaka e Galetti Jr., 2003).

Os resultados obtidos pelo F_{ST} mostraram que os grupos de *L. elongatus* apresentam uma diferenciação genética baixa ($F_{ST} = 0,026$; Tabela 10), quando esses são estimados com os marcadores microssatélites, e moderada (F_{ST} entre 0,095 a 0,106; Tabela 5) quando com os marcadores RAPD [segundo escala sugerida por Wright (1978)]. Quando os grupos foram comparados par a par, os resultados com o marcador RAPD, com algumas exceções, parecem indicar uma tendência de aumento na diferenciação genética entre os grupos ao longo dos anos (Tabelas 4 e 6). No entanto os marcadores microssatélites não indicam tal tendência.

Essa discrepância entre os resultados obtidos pelos dois marcadores, talvez possa ser explicada pelo número de locos avaliados para cada um dos marcadores. Os marcadores microssatélites são considerados mais informativos (detecção de heterozigotos), porém os três 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.

Os valores de F_{ST} apresentados nas Tabelas 5 (RAPD) e 10 (microssatélites) foram significantes ($P < 0,05$), mas indicaram diferenciação genética moderada e baixa,

respectivamente. Similarmente os resultados da AMOVA, apresentados nessas mesmas tabelas mostrou que a maior parte da variação genética está contida dentro dos grupos e não entre os grupos. As outras análises de diversidade genética (distância e identidade) corroboram com os dados acima e revelam que os grupos de *Leporinus elongatus* coletados nas escadas de transposição para peixes de Canoas I e Canoas II têm uma estrutura genética que indica que eles possam compreender uma mesma população.

Dos vários eventos que ocorrem no ciclo vital das espécies, a atividade reprodutiva é o de maior relevância, pois o sucesso biológico de uma espécie é determinado pelo sucesso de um indivíduo em estar geneticamente representado na próxima geração. Desta forma, o sucesso de ocupação e permanência das espécies num dado ecossistema está amplamente associado a um processo de reprodução bem sucedido (Suzuki, 1999).

Segundo Hatanaka e Galetti Jr (2003) informações sobre o efeito da construção de uma barragem na estrutura genética populacional da fauna Neotropical de peixes migradores são praticamente inexistentes. Sabe-se que peixes migradores requerem condições favoráveis para se reproduzirem, determinadas por fatores endógenos e exógenos, os quais controlam os processos migratório e reprodutivo. Barragens obstruem a dispersão e a migração dos organismos aquáticos, afetando principalmente a abundância das espécies migradoras. Esses empreendimentos, ao interromper as rotas migratórias destas espécies, separam os ambientes de desenvolvimento inicial, reprodução e crescimento, o que vem levando ao desaparecimento virtual dos grandes peixes migradores. Além disso, as condições ambientais que prevalecem nos sistemas hidrológicos dessas regiões sofreram profundas mudanças tanto a montante quanto a jusante das barragens. Condições ambientais drásticas, causadas principalmente por redução no fluxo da água (alteração na característica do ambiente de lótico para lêntico), diminuição na temperatura da água e nas taxas de oxigenação, podem estar influenciando determinadas características biológicas dos

organismos aquáticos (Hilsdorf e Petrere, 2002; Agostinho *et al.*, 2002; Hatanaka e Galetti Jr., 2003; Britto e Sirol, 2005; Nilsson *et al.*, 2005).

Visto que a imposição de barreiras geográficas, como as barragens hidroelétricas, isola populações, esses empreendimentos em longo prazo poderão causar a redução do tamanho populacional de muitas espécies devido ao não recrutamento. Essa redução demográfica pode levar a um gargalo de garrafa genético, reduzindo a variabilidade genética da espécie e consequentemente aumentando o risco de extinção da mesma (Agostinho *et al.*, 2002; Hatanaka e Galetti Jr., 2003; Laroche e Durand, 2004). Avaliar a importância dos fatores genéticos que afetam as taxas demográficas de uma população, aumentando a probabilidade de extinção, requer o conhecimento do tamanho efetivo populacional (N_e) atual e histórico, o qual mede o quanto do *pool* gênico é passado para a próxima geração, e é capaz de determinar a taxa de redução da diversidade bem como estimar o grau de endocruzamento. Infelizmente, estimar o N_e atual é difícil e poucas estimativas do N_e histórico existem. Endocruzamento e/ou perda da variabilidade podem aumentar a probabilidade de uma população vir a extinguir-se. Os efeitos do endocruzamento na adaptabilidade de ambos, indivíduo e população, são frequentemente aumentados por ambientes estressantes, Miller (2003).

De acordo com Agostinho *et al.* (2002) “o grau de interferência de um reservatório no processo reprodutivo de uma espécie migradora, depende basicamente de sua posição em relação às áreas críticas do ciclo de vida do peixe (área de desova, berçários e áreas de alimentação). Se a área a montante do reservatório é extensa e contém locais conservados para a reprodução, espera-se que as espécies migradoras que permanecem a montante mantenham seus estoques, com perdas na diversidade genética com o passar do tempo. Neste caso, o objetivo da escada para transposição de peixes seria só a manutenção de diversidade genética, com possível dano para os estoques a jusante da represa. Por outro lado,

extensões curtas a montante que não contenham locais adequados para a reprodução, reduziriam os estoques dos peixes migradores drasticamente, com a possibilidade de serem eliminados da porção a montante do rio após alguns anos. As escadas para transposição, deste modo, poderiam permitir a reprodução a montante. Porém, ovos e larvas seriam carregados para um reservatório cujo as águas mostram baixa velocidade e alta transparência, permitindo intensa predação. A construção de escadas para transposição de peixes, neste caso, representa uma fonte adicional de impacto ao sucesso da reprodução de indivíduos com a chance de realizar o processo reprodutivo a jusante da barragem”.

Acreditamos que esta última situação descrita aconteça no Complexo Canoas. Segundo Dias (2003); Duke Energy (2003) os reservatórios de Canoas I e Canoas II caracterizam-se por possuírem águas lânticas, margens ocupadas por pastagens, escassos remanescentes de vegetação ciliar, ausência das lagoas marginais e grandes tributários; características que são desfavoráveis à conclusão do processo reprodutivo de espécies migradoras. Britto e Sirol (2005), identificaram as espécies migradoras que utilizam as escadas para transposição de peixes das UHEs Canoas I e II. Em estudos, visando avaliar a ocorrência de reprodução dessas espécies nos reservatórios, verificaram que para o período de 2000 a 2002 foi obtida baixa captura para os itens de ictioplâncton (ovos, larvas e pós-larvas) e o período de 2002 a 2004, baixa captura de juvenis, e na identificação do material de ambos os estudos observaram que este não pertencia aquelas espécies migradoras. Esses resultados indicaram que há transposição das barragens, mas não há conclusão do ciclo reprodutivo das espécies migradoras no Complexo Canoas.

Os resultados obtidos para a espécie *Leporinus elongatus*, presente no Complexo Canoas, mostraram que os índices de variabilidade genética encontrados para a mesma são considerados bons, quando comparados a outros estudos já realizados para esta e outras espécie de peixe, o que é de grande importância para a adaptação da espécie a

alterações nas condições ambientais, no caso as causadas pelas barragens presentes no Complexo Canoas.

No entanto o fato de nenhum dos locos microssatélites estarem sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo observado menos heterozigotos do que o esperado, e o de que índices consideráveis de endogamia terem sido detectados dentro de todos os grupos capturados no Complexo Canoas (F_{IS} variando de 0,313 a 0,354), deixam claro que a espécie *L. elongatus* vem apresentando perdas demográficas alarmantes para a prevalência da espécie no Complexo Canoas. Além disso, os parâmetros genéticos estimados com marcadores RAPD e microssatélites para *L. elongatus* mostraram uma diferenciação genética baixa tendendo a moderada entre os grupos provenientes da escada para transposição de Canoas I e entre aqueles provenientes de Canoas II. Com algumas exceções, observa-se uma diferenciação genética progressiva ao longo do tempo entre os 10 grupos amostrados, principalmente com a análise de distancia e identidade genética e F_{ST} par a par realizada com os marcadores RAPD (Tabelas 4 e 6).

Nos estudos ecológicos (Britto e Sirol, 2005), realizados com a espécie *L. elongatus* no Complexo Canoas, não foram obtidos ovos, larvas e nem juvenis, nos esforços de coletas após o período da piracema, nos reservatórios das UHEs desse Complexo; o que indica a não conclusão do ciclo reprodutivo dessa espécie. Sabe-se que os espécimes de *L. elongatus* que realizam a transposição das escadas existentes no Complexo Canoas provêm do Reservatório Capivara à jusante, o qual possui dois grandes e importantes afluentes, os rios Tibagi e o das Cinzas. Neste cenário, a não conclusão do ciclo reprodutivo juntamente com o não retorno dos reprodutores que realizam a migração, estaria causando uma depleção na população a jusante do Complexo Canoas.

Portanto, para este cenário pode-se imaginar as seguintes hipóteses: (1) o tempo de barramento é insuficiente para que se possa detectar uma erosão na variabilidade

genética da espécie com os marcadores utilizados, o que explicaria a manutenção de uma alta variabilidade genética encontrada ao longo do tempo; (2) redução substancial da taxa demográfica da população do reservatório Capivara pela depleção anual do estoque natural, o que explicaria a perda de heterozigosidade e das consideráveis taxas de endocruzamento; e (3) repovoamento dos reservatórios com estoques populacionais com baixa “qualidade” genética, o que também poderia explicar um aumento na endogamia e conseqüente redução de heterozigotos.

Um dos objetivos da biologia da conservação é preservar a diversidade genética em qualquer e possível nível na hierarquia filogenética. Outro objetivo é promover a continuidade dos processos ecológicos e evolutivos que nutrem e sustentam a biodiversidade. Deriva genética, fluxo gênico, seleção natural, seleção sexual, especiação, e hibridização são exemplos dos processos evolutivos naturais e dinâmicos que moldam a distribuição da diversidade genética (Avice, 2004). O conhecimento prévio da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de uma espécie por meio de marcadores moleculares é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento de projetos de manejo, conservação *in situ* e de repovoamento. (Hiltsdorf e Petrere, 2002).

Nesse contexto os dados obtidos no presente estudo para *Leporinus elongatus* provenientes do Complexo Canoas poderão ser utilizados na elaboração de projetos de manejo e conservação dessa espécie neste local do rio Paranapanema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho AA and Gomes LC (2005) O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. In Nogueira, MG, Henry, R and Jorcin, A (eds) Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata. 1st edition. RiMa Editora, São Carlos, pp 23-55.
- Agostinho AA, Gomes LC, Fernandez DR and Suzuki HI (2002) Efficiency of fish ladders for a neotropical ichthyofauna. *River Res Applic* 18:299-306.
- Almeida FS, Fungaro MHP and Sodr e LMK (2001) RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi river, Brasil. *J Zool* 253:113-120.
- Ashikaga FY (2005) Análise da estrutura genética de *Leporinus friderici* (Pisces, Characiformes) nas escadas de transposi o de peixes das UHEs do Complexo Canoas – rio Paranapanema. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, 75 pp.
- Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2nd edition. Sinauer Associates, Massachusetts, 684 pp.
- Borghetti JR, Nogueira SVG, Borghetti NRB and Canzi C (1994) The fish ladder at the Itaipu Binational hydroelectric complex on the Paraná river, Brazil. *Regul Rivers* 9:127-130.
- Britto SG and Sirol RN (2005) Transposi o de peixes como forma de manejo: as escadas do Complexo Canoas, médio rio Paranapanema, bacia do Alto rio Paraná. In Nogueira, MG, Henry, R and Jorcin, A (eds) Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, A es de Manejo e Sistemas em Cascata. 1st edition. RiMa Editora, São Carlos, pp 285-304.
- Chiari L and Sodr e LMK (1999) Genetic variability in five species of Anostomidae (Ostariophysi – Characiformes). *Genet Mol Biol* 22:517-523.
- Chiari L and Sodr e LMK (2001) Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis. *Acta Scient*. 23:445-451.
- DeWoody JA and Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol* 56:461-473.
- Dias JHP (2003) Distribui o Espacial e Temporal da Ictiofauna do Trecho Médio do Rio Paranapanema e suas Rela es com as Características Morfométricas e Limnológicas dos Compartimentos da Bacia. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 103 pp.
- Duke Energy – Gera o Paranapanema (2003) *Peixes do Rio Paranapanema*. 1st edition. Horizonte Geográfico, São Paulo, 112 pp. 2003.
- Excoffier LG, Laval A and Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinfor Online* 1:47-50.

Excoffier LG, 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.

Garavello JC and Britski HA (2003) Family Anostomidae. In Reis, R E, Kullander, SO and Ferraris, CJ (eds) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. 1st edition. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 71-84.

Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

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

Hansen MM and Loeschcke V (1994) Effects of releasing hatchery-reared brown trout to wild trout populations. In: Loeschcke V, Tomiuk J, Jain SK (eds) Conservation Genetics. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp 273-289.

Hartl DL and Clark AG (1997) Principles of Population Genetics. 3rd edition. Sinauer Associates, Massachusetts, 542 pp.

Hatanaka, T and Galetti Jr, PM (2003) RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genet Mol Biol* 26:19-25.

Hilsdorf AW and Petreire MJr (2002) Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje* 30:62-67.

Jager HI, Chandler JA, Lepla KB and Winkle WV (2001) A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on White sturgeon populations. *Environ Biol Fishes* 60:347–361.

Laroche J and Durand JD. (2004) Genetic structure of fragmented populations of a threatened endemic percid of the Rhône river: *Zingel asper*. *Heredity* 92:329-334.

Lopes CM (2005) Análise da estrutura genética de *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characiformes) no Complexo Canoas – rio Paranapanema, como ferramenta de avaliação das escadas de transposição de peixes. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, 67 pp.

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

Lowe A, Harris S and Ashton P (2004) Ecological genetics. Design, analysis and application Blackwell Publishing, Malden, 326 pp.

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

Markert JA, Grant PR, Grant BR, Keller LF, Coombs JL and Petren K (2004) Neutral locus heterozygosity, inbreeding, and survival in Darwin's ground finches (*Geospiza fortis* and *G. scandens*). *Heredity* 92:306-315.

Martins C, Wasko AP, Oliveira C and Foresti F (2003) Mitochondrial DNA variation in wild population of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genet Mol Biol* 26:33-38.

Miller CR and Waits LP (2003) The history of effective population size and genetic diversity in Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): Implications for conservation. *PNAS* 100:4334-4339.

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 and 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, 512 pp.

Nilsson C, Reidy CA, Dynesius M and Revenga C (2005) Fragmentation and flow regulation of the World's large rivers systems. *Science* 308:405-408.

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R and Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 29:294-307.

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 em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 125 pp.

Perez-Sweeney BM, Rodrigues FP and Melnick DJ (2003) Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In Cullen, LJ, Rudran, R and Valladares-Padua, C (eds) *Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre*. 1st edition. Editora UFPR, pp 343-380.

Revaldaves E, Renesto E and Machado MFPS (1997) Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná River. *Braz J Genet* 20:381-388.

Selkoe KA and 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.

Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.

Tajima F (1993) Measurement of DNA polymorphism. In Takahata, N and Clark, AG (eds) *Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology*. Japan Scientific Press, pp 37-59.

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

Tsuchiya 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 em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, 62 pp.

Vandewoestijne S and Baguette M (2002) The genetic structure of endangered populations in the Cranberry Fritillary, *Boloria aquilonaris* (Lepidoptera, Nymphalidae): RAPDs vs allozymes. *Heredity* 89:439-445.

Weir BS and Cockerham CC (1984) Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

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

Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations*. The University of Chicago Press, Chicago, 4: pp 9-103.

4 CONCLUSÕES

- Os índices de variabilidade genética encontrados para *Leporinus elongatus* capturados no Complexo Canoas, quando comparados a outros estudos para esta espécie de peixe e para com outras, são considerados bons.
- Nenhum dos locos microssatélites encontram-se sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo observado menos heterozigotos do que o esperado.
- Um índice considerável de endogamia foi detectado dentro de todos os grupos capturados no Complexo Canoas e aqui analisados.
- Os parâmetros genéticos estimados com marcadores RAPD para *L. elongatus* mostraram uma diferenciação genética moderada entre os grupos provenientes da escada para transposição de Canoas I e entre aqueles provenientes de Canoas II.
- Os parâmetros genéticos estimados com marcadores microssatélites para *L. elongatus* mostraram uma diferenciação genética baixa entre os grupos provenientes da escada para transposição de Canoas I e entre aqueles provenientes de Canoas II.
- Quando os seis grupos de Canoas I são considerados pertencendo a um grande grupo (CI) e os quatro de Canoas II um outro grande grupo (CII), sendo esses comparados entre si, os parâmetros genéticos avaliados com ambos os marcadores repetiram os resultados descritos nos dois tópicos anteriores.
- Com algumas exceções, observa-se uma diferenciação progressiva ao longo do tempo entre os 10 grupos amostrados, principalmente com a análise realizada com os marcadores RAPD.

- No entanto, a diferenciação encontrada entre os grupos deve ser vista com cautela, não podendo cada um dos grupos, de imediato, ser considerado populações diferentes, mas talvez subpopulações de uma população maior predominante no Complexo Canoas.
- A não obtenção de ovos, larvas e juvenis, nos esforços de coletas após o período da piracema, à montante das UHEs de Canoas I e Canoas II pode ser indicativo da não conclusão do ciclo reprodutivo de *L.elongatus*.
- Os espécimes de *L. elongatus* que realizam a transposição das escadas existentes no Complexo Canoas provêm do Reservatório Capivara à jusante, o qual tem como afluentes os rios Tibagi e das Cinzas.
- Neste cenário, a não conclusão do ciclo reprodutivo juntamente com o não retorno dos reprodutores que realizam a migração, estaria causando uma depleção na população o que explicaria os consideráveis índices de endogamia e a perda de heterozigotos.
- A manutenção da variabilidade genética pode ser explicada pelo curto espaço de tempo entre o barramento e o estudo realizado, o que não permitiu a detecção através dos marcadores utilizados de uma possível redução desta variabilidade genética.
- Outra possível razão para os índices de endogamia e a perda de heterozigotos encontrados, seria a introdução com a finalidade de repovoamento de espécimes cultivados em aqüiculturas sem a “qualidade” genética necessária.
- Ações de manejo devem levar em consideração a situação atual da espécie no Complexo Canoas e ser incrementadas com monitoramento genético constante da população natural, bem como das cultivadas em aqüiculturas.
- Esforços maiores devem ser dispensados para a correta identificação dos locais de reprodução da espécie e outros maiores ainda para preservá-los.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL

AGOSTINHO, A. A. Conservação e Manejo de Recursos Aquáticos: Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios. In: AGOSTINHO, A. A.; BENEDITO-CECÍLIO, E. (Eds.). **Situação Atual e Perspectivas da Ictiologia no Brasil: Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Maringá: EDUEM, 1992. p. 106 – 121.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; FERNANDEZ, D. R.; SUZUKI, H. I. Efficiency of fish ladders for Neotropical Ichthyofauna. **River Research and Applications**, United Kingdom: John Wiley & Sons, v. 18, n. 3, p. 299 – 306, 2002.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Orgs.) **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. São Carlos: Ed. RiMa, p. 23 – 55. 2005.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L.C.; LATINI, J. D. Fisheries management in Brazilian reservoirs: lesson from/for South América. **Interciencia**, Caracas: v. 29, n. 6, p.334 – 338, 2004.

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO Jr, H. F.; GOMES, L. C.; BINI, L. M.; AGOSTINHO, C. S. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Eds.). **A planície de Inundação do Alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, 1997a. p. 179 – 208.

AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S.; GOMES, L. C.; BINI, L. M. Estrutura trófica. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Eds.). **A planície de Inundação do Alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, 1997b. p. 229 – 248.

ALI, B. A.; HUANG, T.; QIN, D.; WANG, X. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 14, n. 4, p. 443 – 453, 2004.

ALLNUTT, T. R.; NEWTON, A. C.; PREMOLI, A.; LARA, A. Genetic variation in the threatened South American conifer *Pilgeiodendron uviferum* (Cupressaceae), detected using RAPD markers. **Biological Conservation**, v. 114, p. 245 – 253, 2003.

ALMEIDA, F. S.; FUNGARO, M. H. P.; SODRÉ, L. M. K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi river, Brasil. **Journal of Zoology**, United Kingdom: The Zoological Society of London, v. 253, p. 113 – 120, 2001.

ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. Population structure of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, SP: Brazilian Society of Genetics, v. 26, n. 3, p. 301 – 305, 2003.

ASHIKAGA, F. Y. **Análise da estrutura genética de *Leporinus friderici* (Pisces, Characiformes) nas escadas de transposição de peixes das UHEs do Complexo Canoas – rio Paranapanema**. 2005. 75 p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. 2 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004. 684 p.

BORGHETTI, J. R.; NOGUEIRA, S. V. G.; BORGHETTI, N. R. B.; CANZI, C. The fish ladder at the Itaipu Binational hydroelectric complex on the Paraná river, Brazil. **Regulated Rivers** v. 9, p. 127 – 130, 1994.

BRAHMANE, M. P. Use of RAPD fingerprinting for delineating populations of hilsa shad *Tenuulosa ilisha* (Hamilton, 1822). **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 4, 2006.

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

CHIARI, L.; SODRÉ, L. M. K. Genetic variability in five species of Anostomidae (Ostariophysi – Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 517 – 523, 1999.

CHIARI, L.; SODRÉ, L. M. K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis. **Acta Scientiarum**, Maringá, PR: EDUEM, v. 23, n. 2, p. 445 – 451, 2001.

CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 1 – 29, 2006.

DeWOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p. 461 – 473, 2000.

DIAS, J. H. P. **Distribuição Espacial e Temporal da Ictiofauna do Trecho Médio do Rio Paranapanema e suas Relações com as Características Morfométricas e Limnológicas dos Compartimentos da Bacia**. 2003. 103 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

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

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

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

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.

GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A. *Leporinus macrocephalus* SP. N. da bacia do rio Paraguai (Ostariophysi, Anostomidae). **Naturalia**, v. 13, p. 67 – 74, 1988.

GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A. Family Anostomidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 71 – 84.

GODOY, M. P. Subordem Characoidei. In: _____. **Peixes do Brasil: Bacia do rio Mogi Guassu v. III**. Piracicaba, SP: Franciscana, 1975. p. 539 – 552.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>, 2001.

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

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy –Weinberg proportion for multiples alleles. **Biometrics** v. 48, P. 361 - 372, 1992.

HAHN, N. S.; ANDRIAN, I. F.; FUGI, R.; ALMEIDA, V. L. L. Ecologia trófica. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Eds.). **A planície de Inundação do Alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, 1997. p. 209 – 228.

HANSEN, M. M.; LOESCHCKE, V. Effects of releasing hatchery-reared brown trout to wild trout populations. In: LOESCHCKE, V.; TOMIUK, J.; JAIN, S. K. (eds) **Conservation Genetics**. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 1994. p. 273 – 289.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. 3 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1997. 542 p.

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

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

HOFFMANN, A.C. **Análise da Ictiofauna do Reservatório da UHE Escola Mackenzie, rio Paranapanema (Estados de São Paulo e Paraná)**. 2003. 144 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

HUANG, C.; LIN, Y.; CHEN, J. The use of RAPD markers to assess catfish hybridization. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, n. 12, p. 3003 – 3014, 2005.

JAGER, H. I.; CHANDLER, J.A.; LEPLA, K.B.; WINKLE, W.V. A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on White sturgeon populations. **Environmental Biology of Fishes**, v. 60, p. 347 – 361, 2001.

JAYASANKAR, P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting resolves species ambiguity of domesticated clown fish (genus: *Amphiprion*, family: Pomacentridae) from India. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 10, p. 1006 – 1009, 2004.

LAROCHE, J.; DURAND, J. D. Genetic structure of fragmented populations of a threatened endemic percid of the Rhone river: *Zingel asper*. **Heredity**, v. 92, p. 329 – 334, 2004.

LEVIN, P. S.; SCHIEWE, M. H. Preserving salmon biodiversity. **American Scientist**, May-June, p. 220 – 227, 2001.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker Technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, p. 1 – 37, 2004.

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

LOUGHEED, S. C.; GIBBS, H.L.; PRIOR, K. A.; WEATHERHEAD, P. J. A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the Massasauga rattlesnake. **The Journal of Heredity**, v. 91, n. 6, p. 458 – 463, 2000.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological Genetics: Design, Analysis and Application.** Blackwell Publishing, 2004. p. 326.

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

MARKERT, J. A.; GRANT, P.R.; GRANT, B. R.; KELLER, L. F.; COOMBS, J. L.; PETREN, K. Neutral locus heterozygosity, inbreeding, and survival in Darwin's ground finches (*Geospiza fortis* and *G. scandens*). **Heredity**, v. 92, p. 306 – 315, 2004.

MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild population of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 33 – 38, 2003.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução.** Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 153 – 163.

MILLER, C. R.; WAITS, L. P. The history of effective population size and genetic diversity in Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): Implications for conservation. **PNAS**, v. 100, n. 7, p. 4334 – 4339, 2003.

MILLER, M. P. 1997. **Tools for population genetic analyses TFPGA 1.3:** a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Department of Biologicals Sciences, Northern Arizona University. MPM2@jan.ucc.nau.edu, Computer software distributed by author.

MORELLI, K. A.; REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* v.7, p.32 - 34, 2007.

MOYLE, P. B.; CECH, J. J. **Fishes**: An introduction to ichthyology. 4. ed. Upper Saddle Rive, NJ: Prentice-Hall, 2000. 612 p.

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

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York. Columbia University Press, 1987. 512 p.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. 600 p.

NILSSON, C.; REIDY, C.A.; DYNESIUS, M.; REVENGA, C. Fragmentation and flow regulation of the World's large rivers systems. *Science* v. 308, p. 405 - 408, 2005.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294 – 307, 2006.

ORMEROD, S. J. Current issues with fish and fisheries: editor's overview and introduction. **Journal of Applied Ecology**., British Ecological Society, v. 40, p. 204 – 213, 2003.

PAULA, F. M. **Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das Usinas Hidroelétricas do Complexo Canoas – rio Paranapanema**. 2006. 125 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN, L. J.; RUDRAN, R.; VALADARES-PADUA, C. (Orgs.) **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida Silvestre**. Curitiba: Ed. UFPR, 2003. p. 343 – 380.

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

RUBIN, C. S.; WARNER, R. E.; BOUZAT, J. L.; PAIGE, K. N. Population structure of Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*) in a urban landscape. **Biological Conservation**, v. 99, p. 323 – 330, 2001.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p. 615 – 629, 2006.

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

SUZUKI, H. I. **Estratégias reprodutivas de peixes relacionadas ao sucesso na colonização em dois reservatórios do rio Iguçu, PR, Brasil.** Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999. 97 p.

TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, v.105, p. 437 - 460, 1983.

TAJIMA, F. Measurement of DNA polymorphism. In TAKAHATA, N.; CLARK, A. G. (Eds.) **Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology.** Tokyo. Japan Scientific Press, 1993. p. 37-59.

TORRES, R. A.; MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F. Genética de peixes neotropicais. *Biologia Molecular de peixes neotropicais.* **Biologia e Saúde**, v. 10, p. 27 – 3, 2004.

TSUCHIYA, M. T. N. **Análise da estrutura genética de *Schizodon nasutus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das UHEs do Complexo Canoas – rio Paranapanema.** 2006. 62 p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina.

VANDEWOESTIJNE, S.; BAGUETTE, M. The genetic structure of endangered populations in the Cranberry Fritillary, *Boloria aquilonaris* (Lepidoptera, Nymphalidae): RAPDs vs allozymes. **Heredity**, v. 89, p. 439 – 445, 2002.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática.** Maringá: EDUEM, 1996. 169 p.

WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 20, n. 1, p. 48 – 52, 2004.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n. 24, p. 7213 – 7218, 1990.

WHITELEY, A. R.; SPRUELL, P.; ALLENDORF, F. W. Ecological and life history characteristics predict population genetic divergence of two salmonids in the same landscape. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 12, p. 3675 – 3688, 2004.

WILLIAMS, J.G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531 – 6535, 1990.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F statistics for the analysis of population structure. **Evolution** v. 38, p. 1358 - 1370, 1984.

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

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

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

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