

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

RAFAEL CEZAR CAVARETTO

Utilização do DNA *Barcoding* como ferramenta no estudo do ictioplâncton e na
avaliação do estabelecimento de espécies não-nativas

Toledo
2019

RAFAEL CEZAR CAVARETTO

Utilização do DNA *Barcoding* como ferramenta no estudo do ictioplâncton e na avaliação do estabelecimento de espécies não-nativas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maristela Cavicchioli Makrakis

Toledo

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Cavaretto, Rafael Cezar

Utilização do DNA Barcoding como ferramenta no estudo do ictioplâncton e na avaliação do estabelecimento de espécies não-nativas / Rafael Cezar Cavaretto; orientador(a), Maristela Cavicchioli Makrakis, 2019.

64 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2019.

1. Ictioplâncton. 2. DNA Barcoding. 3. Invasão biológica. I. Makrakis, Maristela Cavicchioli. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAFAEL CEZAR CAVARETTO

Utilização do DNA *Barcoding* como ferramenta no estudo do ictioplâncton e na avaliação do estabelecimento de espécies não-nativas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Maristela Cavicchioli Makrakis
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Elaine Antoniassi Luiz Kashiwaqui
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Prof.^a Dr.^a Lenice Souza Shibatta
Universidade Estadual de Londrina

Aprovada em: 1º de março de 2019.

Local de defesa: Sala 15 – Bloco E, Unioeste/*Campus* de Toledo.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, que sempre acreditaram ser a educação a melhor herança que poderiam deixar a seus filhos.

"Eu não sei nada sobre as grandes coisas do mundo, mas sobre as pequenas eu sei menos."

Manoel de Barros

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maristela Cavicchioli Makrakis, que, com serenidade, comprometimento e profissionalismo, conduziu a construção do presente trabalho. Agradeço também ao Prof. Dr. Sérgio Makrakis, que me abriu as portas do Grupo de Pesquisa em Tecnologia em Ecohidráulica e Conservação de Recursos Pesqueiros - GETECH, viabilizando a realização do meu projeto.

À Prof.^a Dr.^a Lenice Souza Shibatta, que pacientemente me ajudou a desenvolver a etapa laboratorial e contribuiu com muitas ideias e sugestões. Obrigado pelas críticas, que me fizeram crescer, e pelas conversas, conselhos e carinho que tornaram minha passagem por Londrina mais alegre e proveitosa. Ainda que não oficialmente, assumiu o papel de minha coorientadora e me “adotou” como seu pupilo.

À Prof.^a Dr.^a Elaine Antoniassi Luiz Kashiwaqui, pelas colaborações a esse trabalho e por ser uma profissional que inspira, tamanho o conhecimento e amor pelo que faz.

Sou grato ao Ministério Público do Estado de Mato Grosso do Sul – MPE/MS, por valorizar a formação de seus servidores e me conceder licença para cursar o Mestrado.

À Companhia Energética de São Paulo – CESP, pelo apoio financeiro e logístico para execução dessa pesquisa. Um agradecimento especial ao Sergio Bovolenta, por nos resgatar de madrugada, quando ficamos à deriva no rio!

Gratidão aos meus amigos de laboratório, pela parceria, momentos de descontração e pelos ensinamentos. Agradeço à Patrícia Sarai da Silva, por me introduzir ao mundo do ictioplâncton e por sua calma e competência ao compartilhar seu conhecimento. Agradeço ao Leandro Celestino, por ser um grande amigo e um exemplo de superação e determinação. Ao Jhony Mendonça, pela parceria durante os últimos dois anos, pelo cafezinho e por ter elaborado os mapas deste trabalho. À Suelen Pini, uma grande amiga, que conseguia tornar o ambiente muito mais agradável, mesmo quando tínhamos centenas de peixes para analisar. Ao Fábio Luiz, pela amizade e pelo auxílio primordial nas coletas. À galera do Amapá, Adriani Monteiro, Diego Rangel e Wane Picanço, que conquistaram meu coração em tão pouco tempo. Aos demais colegas do GETECH, Ana Bertão, Dihego Fernandes, Elaine Celestino, Evelin Teixeira, Jorge Vicente, Karane Silvestre, Lucileine de Assumpção e Pércimo Chiarretto, meu muito obrigado!!

À Karen Izabela, Ahiana Cássia e Silvana Rezende, amigas da pós-graduação que gostaria de manter por perto por toda a vida.

E, por fim, toda minha gratidão e amor à minha família, sobretudo meus pais, Aparecida e Lourival Cavaretto, que cuidaram de tudo em Campo Grande para que eu pudesse me dedicar com tranquilidade ao Mestrado. Obrigado por terem investido em minha educação e na formação do meu caráter. Aos meus irmãos, Juliana, Larissa e Gabriel, por serem exemplo de dedicação e força de vontade. Ao Berinaldo Bueno, pelo amparo, carinho, exemplo de vida e puxões de orelha.

Utilização do DNA *Barcoding* como ferramenta no estudo do ictioplâncton e na avaliação do estabelecimento de espécies não-nativas

RESUMO

A identificação da megadiversa ictiofauna neotropical constitui um grande desafio, sobretudo nas fases iniciais do desenvolvimento, quando os poucos caracteres diagnósticos ainda podem ser compartilhados entre espécies. Com o intuito de superar as limitações da taxonomia tradicional, técnicas moleculares, como o DNA *Barcoding*, têm sido utilizadas com sucesso na identificação de peixes em seus diversos estágios de vida, por sua capacidade de discriminar espécies, mesmo quando intimamente relacionadas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a utilização conjunta da taxonomia tradicional, baseada em caracteres morfométricos e merísticos, e do DNA *Barcoding* na identificação da comunidade ictioplanctônica em três tributários do Reservatório de Porto Primavera, na bacia do Alto Rio Paraná. Esta técnica molecular também foi utilizada para avaliar o estabelecimento (reprodução e recrutamento) de espécies não-nativas nesta bacia, particularmente da espécie *Leporinus tigrinus* Borodin, 1929. Os resultados deste estudo revelaram que a utilização do DNA *Barcoding* pode ampliar expressivamente a resolutividade taxonômica alcançada pela identificação clássica. No entanto, ao ser empregada preliminarmente, a identificação taxonômica tradicional pode otimizar o tempo, reduzir custos e orientar a amostragem do material a ser encaminhado à identificação molecular. O DNA *Barcoding* contribuiu, ainda, para classificar a espécie *L. tigrinus* como não-nativa e confirmar o seu estabelecimento na bacia do Alto Rio Paraná. Esta espécie apresenta um modelo de introdução e dispersão diferente da maioria das espécies exóticas estabelecidas nesta bacia.

Palavras-chave: Taxonomia. Identificação Molecular. Introdução de Espécies. Estabelecimento. Dispersão.

DNA Barcoding as a tool to study the ichthyoplankton and evaluate the establishment of non-native species

ABSTRACT

The identification of the megadiverse Neotropical fish fauna is a major challenge, especially in the early stages of development, when the few diagnostic characters can still be shared between species. In order to overcome the limitations of traditional taxonomy, molecular techniques, such as DNA Barcoding, have been successfully used to identify fish in their various life stages, due to their ability to discriminate species, even when closely allied. Thus, the present study aimed to evaluate the joint use of the traditional taxonomy, based on morphometric and meristic characters, and DNA Barcoding in the identification of the ichthyoplankton community in three tributaries of the Porto Primavera Reservoir, in the Upper Paraná River basin. This molecular technique was also used to evaluate the establishment (reproduction and recruitment) of non-native species in this basin, particularly *Leporinus tigrinus* Borodin, 1929. The results of this study reveal that the use of DNA Barcoding can significantly increase the taxonomic resolution achieved by classical identification. However, when used preliminarily, traditional taxonomic identification can optimize time, reduce costs and guide the sampling of the material to be routed to molecular identification. The DNA Barcoding also contributed to classify *L. tigrinus* as a non-native species and to confirm its establishment in the Upper Paraná River basin. This species presents a model of introduction and dispersion different from most alien species established in this basin

Keywords: Taxonomy. Molecular Identification. Species Introduction. Establishment. Dispersal.

SUMÁRIO

Capítulo 1: Associando taxonomia tradicional e DNA <i>Barcoding</i> no estudo do ictioplâncton em tributários do Alto Rio Paraná	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1 Área de estudo	14
2.2 Coleta de dados.....	14
2.3 Identificação pela taxonomia tradicional.....	15
2.4 Extração do DNA, amplificação e sequenciamento do gene COI	16
2.5 Qualidade do DNA sequenciado e análise de dados	16
3 RESULTADOS	17
4 DISCUSSÃO	28
4.1 Associando metodologias	28
4.2 Particularidades na identificação molecular	29
4.3 Composição taxonômica do ictioplâncton	32
5 REFERÊNCIAS	35
Capítulo 2: Invasão biológica em uma cascata de reservatórios: o caso de <i>Leporinus tigrinus</i> (Characiformes, Anostomidae) na bacia do Alto Rio Paraná	43
1 INTRODUÇÃO	45
2 MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1 Área de Estudo	47
2.2 Obtenção de dados de ocorrência, reprodução e recrutamento.....	48
2.3 Identificação molecular do ictioplâncton	49
2.4 Traços ecológicos - composição da dieta	50
3 RESULTADOS	50
3.1 Ocorrência e Dispersão	50
3.2 Reprodução e Recrutamento.....	54
3.3 Composição da Dieta.....	54
4 DISCUSSÃO	55
5 REFERÊNCIAS	60

Capítulo 1 elaborado e formatado conforme as normas da publicação científica *Hydrobiologia*. Disponível em: <https://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/10750?detailsPage=pltc_i_911058>

Capítulo 1: Associando taxonomia tradicional e DNA *Barcoding* no estudo do ictioplâncton em tributários do Alto Rio Paraná

RESUMO

Os ecossistemas de água doce neotropicais apresentam uma ictiofauna megadiversa e a identificação do ictioplâncton nestes ambientes, baseando-se em caracteres morfométricos e merísticos, possui limitações. Na última década, a utilização do DNA *Barcoding* na identificação de ovos e larvas de peixes tem se difundido, por possibilitar a identificação de um maior número de espécies em comparação com a identificação taxonômica clássica. Assim, o presente estudo buscou associar a taxonomia tradicional e o DNA *Barcoding* na identificação da comunidade ictioplanctônica em tributários do Alto Rio Paraná. Foram realizadas coletas mensais do ictioplâncton na calha principal dos rios Aguapeí, Pardo e Verde, entre novembro de 2017 e abril de 2018, em trechos onde esses cursos d'água conservam as características naturais do regime de vazão. Larvas foram identificadas preliminarmente pela taxonomia tradicional e, na sequência, ovos e larvas não identificados foram encaminhados para a identificação pela técnica do DNA *Barcoding*. Associando os resultados da taxonomia tradicional com a técnica molecular, chegou-se à identificação de 48 táxons, sendo que 42 alcançaram resolução taxonômica em nível de espécie, 04 em nível genérico, 02 em nível de família. Este número foi superior ao registrado por outros trabalhos na bacia. Aproximadamente metade das espécies registradas não são nativas da bacia do Alto Rio Paraná. A identificação morfológica preliminar do ictioplâncton otimizou o processo e orientou a subamostragem do material a ser submetido a análises moleculares, enquanto o DNA *Barcoding* melhorou expressivamente a resolutividade taxonômica e indicou quais grupos devem ser alvo de estudos complementares para eventual detecção e descrição de novas espécies (possíveis espécies crípticas). Por meio da identificação molecular, foi realizado o primeiro registro da espécie não-nativa *Cyphocharax gillii* na bacia do Alto Rio Paraná.

Palavras-chave: Barcode. Morfometria. Espécies não-nativas. Espécies Crípticas.

ABSTRACT

Neotropical freshwater ecosystems present a megadiverse ichthyofauna and the identification of ichthyoplankton in these environments, based on morphometric and meristic characters, has limitations. In the last decade, the use of DNA Barcoding in the identification of fish eggs and larvae has become widespread, since it allows the identification of more species in comparison with the classic taxonomic identification. Thus, the present study sought to associate traditional taxonomy and DNA Barcoding in the identification of the ichthyoplankton community in tributaries of the Upper Paraná River. Ichthyoplankton samplings were carried out monthly in the main channel of the Aguapeí, Pardo and Verde Rivers between November 2017 and April 2018, in stretches where these watercourses retain the natural characteristics of the flow regime. Larvae were preliminarily identified by the traditional taxonomy and, subsequently, eggs and unidentified larvae were referred for identification by the DNA Barcoding technique. Associating the results of the traditional taxonomy with the molecular technique, 48 taxa were identified, 42 of which reached a taxonomical resolution at the species level, 04 at the generic level, 02 at the family level. This number was higher than those recorded by other works in this basin. Approximately half of the recorded species are not native to the Upper Paraná River basin. The preliminary morphological identification of ichthyoplankton optimized the process and guided the sub-sampling of the material to be subjected to molecular analyzes, while DNA Barcoding significantly improved the taxonomic resolution and indicated which groups should be the subject of complementary studies for possible detection and description of new species (possible cryptic species). Through molecular identification, the non-native species *Cyphocharax gillii* was recorded for the first time in the Upper Paraná River basin.

Keywords: Barcode. Morphometry. Alien Species. Cryptic Species.

1 INTRODUÇÃO

Embora sejam detentores de uma ictiofauna megadiversa, ainda longe de ser conhecida em sua totalidade (Reis et al., 2016), os ecossistemas de água doce neotropicais encontram-se sob a crescente ameaça de atividades desenvolvidas de maneira não-sustentável, como a construção de milhares de usinas hidrelétricas, a introdução de espécies não-nativas, o desmatamento, a poluição, más práticas agrícolas e mineração (Barletta et al., 2010; Pelicice et al., 2017; Tófoli et al., 2017). No Brasil, novos empreendimentos hidrelétricos se multiplicam tanto em bacias já intensamente reguladas (Nilsson et al., 2005; ANEEL, 2019) como em regiões relativamente bem preservadas e até recentemente pouco exploradas para este fim (Lees et al., 2016; Winemiller et al., 2016).

A construção de usinas hidrelétricas converte ambientes lóticos em ambientes lênticos, alterando regimes naturais de vazão e características cruciais do pulso de inundação (Timpe & Kaplan, 2017). Consequentemente, sucedem-se alterações nas variáveis físico-químicas da água (Gao et al., 2013), no transporte de nutrientes e sedimentos (Ligon et al., 1995; Graf, 2006) e no padrão de produtividade primária destes ecossistemas (Martinet et al., 2016), que aliadas à fragmentação, modificação e perda de habitats, impactam profundamente a biota aquática, sobretudo a assembleia de peixes (Agostinho et al., 2016; Santos et al., 2018).

Além de sofrerem pressões nos seus estoques pela pesca, devido ao seu grande tamanho corporal e elevado valor comercial (Hoeinghaus et al., 2009), os peixes migradores de longas distâncias são os mais afetados pelos barramentos, que interceptam suas rotas migratórias, modificam habitats essenciais ao seu ciclo de vida (áreas de desova e berçários; Carolsfeld et al., 2003) e alteram as condições hidrológicas que são gatilhos para a maturação gonadal e o início da migração (Vazzoler, 1996; Nabi et al., 2014). Assim, essas espécies podem sofrer drásticas reduções em sua abundância e até mesmo serem localmente extintas em bacias fortemente reguladas, enquanto espécies sedentárias, de pequeno tamanho corporal, plasticidade alimentar e tolerantes a variações ambientais tendem a se proliferar nestes locais (Agostinho et al., 2008, 2016; Santos et al., 2017). Outrossim, alterações ambientais promovidas pela construção de usinas hidrelétricas podem favorecer a dispersão (Júlio Júnior et al., 2009; Vitule et al., 2012) e o estabelecimento de espécies não-nativas (Havel et al., 2005).

Estudos sobre a composição e distribuição do ictioplâncton em tributários revelam a importância destes cursos d'água para a conservação da ictiofauna em bacias onde o rio principal encontra-se severamente impactado por hidrelétricas (Reynalte-Tataje et al., 2013; Da

Silva et al., 2015; Silva et al., 2017a). Quando livres de barragens ou apenas levemente regulados, os tributários mantêm características naturais do regime de vazão, constituindo importantes rotas migratórias (Makrakis et al., 2012) e provendo sítios de desova e desenvolvimento inicial para várias espécies (Da Silva et al., 2019).

Entretanto, a identificação de ovos e larvas por meio da taxonomia tradicional, baseada em características morfométricas e merísticas, apresenta limitações. O número reduzido de espécies descritas nas fases iniciais de desenvolvimento (Nakatani et al., 2001), a insuficiência de caracteres diagnósticos e o compartilhamento destes caracteres entre espécies relacionadas (Becker et al., 2015; Da Silva et al., 2015) tornam a identificação do ictioplâncton uma tarefa desafiadora. Deste modo, na maioria dos estudos sobre o ictioplâncton em ambientes neotropicais, ovos não são identificados e larvas nem sempre alcançam resolução taxonômica em nível específico (Reynalte-Tataje et al., 2012; Gogola et al., 2013; Suzuki & Pompeu, 2016; Silva et al., 2017b). Ademais, muitas larvas são excessivamente danificadas durante os procedimentos de coleta, o que inviabiliza qualquer esforço para a identificação taxonômica.

No decorrer da última década, a utilização do *DNA Barcoding* tem se difundido, possibilitando a identificação de um número maior de espécies de peixes nas fases iniciais de desenvolvimento (Valdez-Moreno et al., 2010; Ko et al., 2013; Becker et al., 2015; Frantine-Silva et al., 2015; Hubert et al., 2015; Leyva-Cruz et al., 2016; Hofmann et al., 2017). Esta técnica se baseia na baixa variabilidade intraespecífica e alta variabilidade interespecífica de um fragmento de 648 pb do gene mitocondrial citocromo C oxidase subunidade 1 (COI), que permite a discriminação da maioria das espécies (Hebert et al., 2003a, 2003b).

Considerando que o *DNA Barcoding* pode ser utilizado como uma ferramenta na identificação do ictioplâncton mesmo em ecorregiões com elevada biodiversidade, com potencial aplicabilidade no monitoramento, avaliação ambiental e manejo da ictiofauna, bem como na detecção de espécies não-nativas (Frantine-Silva et al., 2015; Almeida et al., 2018), este estudo associou a taxonomia tradicional e o *DNA Barcoding* na identificação da comunidade ictioplanctônica em tributários de um grande rio Neotropical intensamente regulado, o Alto Rio Paraná.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Com aproximadamente 190 km de extensão e área de 2040 km², o reservatório da Usina Hidrelétrica (UHE) Engenheiro Sergio Motta, conhecida como Porto Primavera, pertencente a Companhia Energética de São Paulo, é o maior do Rio Paraná. Embora a construção desta usina tenha convertido em ambiente lântico a metade superior da extensa planície de inundação do Alto Rio Paraná, seu reservatório apresenta tributários com segmentos lóticos consideráveis (Da Silva et al., 2019) e se conecta ao trecho não regulado remanescente do Rio Paraná por meio de uma escada para peixes localizada em sua margem esquerda (Gutfreund et al., 2018; Celestino et al., 2019).

Amostragens mensais foram realizadas entre novembro de 2017 e abril de 2018, em três grandes tributários do Reservatório de Porto Primavera (Fig. 1): rios Aguapéi (livre de barragens), Pardo e Verde (levemente regulados em seu trecho superior). Nos trechos amostrados, os tributários mantêm as características naturais do regime de vazão e apresentam matas ciliares em bom estado de conservação, entremeadas por lagoas e áreas de várzea que se conectam ao rio no período chuvoso (outubro a março).

2.2 Coleta de dados

Um sítio amostral foi estabelecido na calha de cada tributário (Fig. 1), onde foram realizados arrastos horizontais durante 10 min na subsuperfície da água (20 cm de profundidade), entre 21 e 23h, utilizando-se rede de plâncton cônico-cilíndrica de 0,5mm de malha, com fluxômetro acoplado à boca para a obtenção do volume de água filtrada. Na sequência, o mesmo procedimento foi replicado. As amostras foram conservadas em etanol 90% e mantidas resfriadas até serem armazenadas em congeladores à temperatura de -20°C, em laboratório.

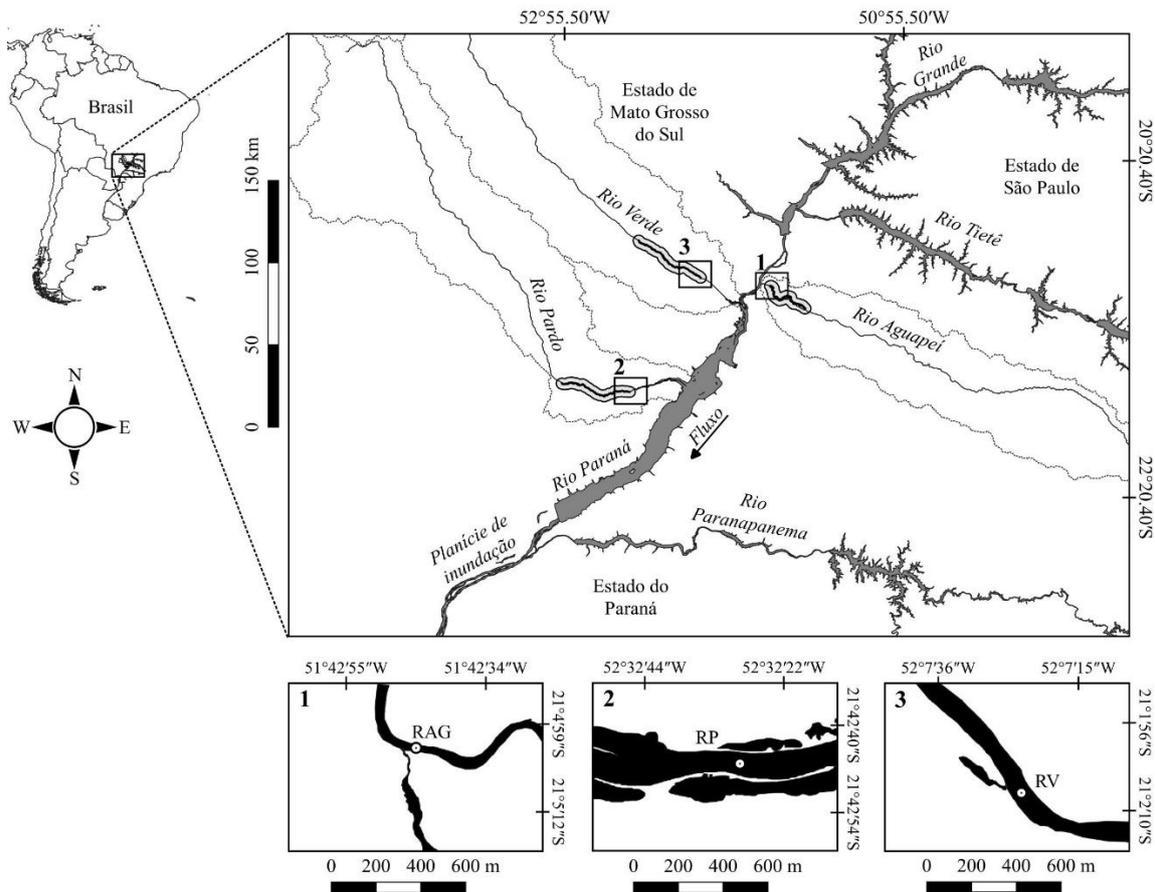


Figura 1. Distribuição dos sítios amostrais (em destaque) ao longo dos tributários do Reservatório de Porto Primavera, Alto Rio Paraná. Os trechos delimitados por quadrados foram ampliados na parte inferior da imagem. 1. RAG – Rio Aguapeí (21°03'12,99"S; 51°41'21,99"O); 2. RP – Rio Pardo (21°41'20,72"S; 52°28'54,00"O); 3. RV – Rio Verde (21°01'53,16"S; 52°07'34,99"O).

2.3 Identificação pela taxonomia tradicional

No processo de triagem, ovos e larvas foram separados de outros organismos e detritos. Este procedimento foi realizado com auxílio de um microscópio estereoscópio sobre placa de acrílico do tipo *Bogorov*. As amostras de cada sítio amostral foram reunidas com suas réplicas para compor uma única amostra por tributário. A identificação das larvas de peixes foi realizada até o menor nível taxonômico possível, seguindo a técnica sugerida por Ahlstrom & Moser (1976) e adaptada por Nakatani et al. (2001), considerando as características morfométricas e merísticas (formato do corpo; formato e posição dos olhos; padrão de pigmentação; presença de barbêlões, posição e sequência de formação das nadadeiras; posição da abertura anal; número de miômeros e raios de nadadeiras). A classificação taxonômica foi realizada de acordo com Ota et al. (2018).

As espécies foram classificadas em diferentes estratégias reprodutivas (migradoras de longas distâncias e não migradoras/migradoras de curtas distâncias) de acordo com Suzuki et al. (2004). Além disso, as espécies foram avaliadas quanto a sua origem em nativa e não-nativa, seguindo Ota et al. (2018).

2.4 Extração do DNA, amplificação e sequenciamento do gene COI

Larvas não identificadas em nível específico pela metodologia descrita anteriormente, larvas danificadas não-identificáveis e ovos (com ou sem membrana) foram submetidos à extração de DNA após passarem por uma amostragem com o objetivo de reduzir a quantidade de material a ser processado. Para tanto, até 40 ovos e larvas de cada morfotipo (tamanho, forma e demais características morfológicas e merísticas semelhantes) foram selecionados para análises genéticas.

A extração foi realizada com resina Chelex 100 (*Bio-Rad*) e proteinase K (*Invitrogen*). Após a extração, o gene COI foi amplificado de acordo com Frantine-Silva et al. (2015), utilizando os *primers* *FishF1* e *FishR1* descritos por Ward et al. (2005). Os produtos da PCR foram purificados e, na sequência, sequenciados e analisados em sequenciador automático *ABI PRISM 3500 XL* (*Applied Biosystems*).

2.5 Qualidade do DNA sequenciado e análise de dados

O sequenciamento do gene COI gerou produtos de aproximadamente 600 pb para a maioria das amostras, não sendo constatadas inserções, deleções ou códons de parada. As sequências foram comparadas com o banco de dados do *Barcode of Life Data-BOLD* (Ratnasingham & Hebert, 2007), por meio do *BOLD Identification System-IDS* (sistema de identificação), disponível em http://boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine. Quando não houve correspondência no *BOLD IDS*, as sequências foram comparadas com o banco de dados do *Genbank*, através do *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Embora a identificação dos grupos taxonômicos tenha sido avaliada caso a caso, em geral foram seguidos os limiares utilizados por Almeida et al. (2018). Aos espécimes com similaridades de sequência $\geq 98,5\%$ em relação à referência, foram atribuídas identificações em

nível específico. Similaridades $\geq 94\%$ e $< 98,5\%$ identificaram gênero e similaridades $< 94\%$ identificaram a família.

Análises de distância genética foram realizadas com as sequências do gene COI. Quando as distâncias genéticas máximas intraespecíficas foram superiores a 1,5% ou quando havia incertezas quanto à identificação das espécies, foram construídas árvores de distância genética pelo método *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), para elucidar relações filogenéticas e confirmar o enquadramento taxonômico. Essa abordagem possibilitou apurar a eventual separação de indivíduos de uma mesma espécie em *clusters* distintos. Nestes casos, também foi verificado se as sequências de uma única espécie foram associadas a mais de um *Barcode Index Number (BIN)*. O *BIN* é o código alfanumérico exclusivo atribuído a um conjunto de sequências similares armazenadas no *BOLD* que correspondem a uma mesma Unidade Taxonômica Operacional (UTO). As UTOS, delineadas por meio de um algoritmo (RESL) no banco de dados do *BOLD*, são calibradas a medida que novas sequências são depositadas, de modo que cada UTO corresponda com bastante fidelidade a uma espécie (Ratnasingham & Hebert, 2013). Assim, os *BINs* são úteis para estimar o número de espécies diretamente a partir dos registros *barcodes*, independentemente de diagnóstico taxonômico (Cardoso et al., 2018) e podem indicar, preliminarmente, a existência de espécies crípticas a serem confirmadas por outros métodos analíticos. O banco de dados de *BINs* está disponível em <http://www.boldsystems.org/bin>.

As análises de distância genética e as árvores *Neighbor-Joining* basearam-se no modelo Kimura 2-Parâmetros (K2P; Kimura, 1980) e foram realizadas no programa *MEGA7* (Kumar et al., 2016).

3 RESULTADOS

Durante o período de estudo foram coletadas 18 amostras, que resultaram em 793 ovos e 689 larvas. Após a subamostragem, 401 ovos e 641 larvas foram submetidas às metodologias de identificação, que resultaram na identificação taxonômica de 132 ovos (32,92% do material analisado) e 399 larvas (62,25%).

Por meio das características morfométricas e merísticas, foi possível identificar 184 larvas como pertencentes a 09 espécies, o que corresponde a 46,12% do total de larvas identificadas com esse grau de resolutividade taxonômica. Das 09 espécies registradas (Tabela 1), 03 foram identificadas exclusivamente por esta metodologia (*Parauchenipterus galeatus*,

Pterygoplichthys ambrosettii e *Tatia neivai*). Ainda se valendo da taxonomia clássica, larvas foram identificadas em nível genérico (*Eigenmannia* sp., *Hoplías* sp. e *Serrasalmus* sp.), em famílias (Anostomidae, Characidae e Heptapteridae) e em ordem (Gymnotiformes).

A técnica do *DNA Barcoding* possibilitou a identificação de 39 táxons em nível específico, 04 táxons em nível genérico e 02 em nível de família (Tabelas 1 e 2). Ovos foram identificados apenas por esta técnica e corresponderam a 13 espécies (*Leporinus friderici*, *Leporinus tigrinus*, *Megaleporinus obtusidens*, *Schizodon borellii*, *Rhaphiodon vulpinus*, *Hemiodus orthonops*, *Prochilodus lineatus*, *Pterodoras granulosus*, *Pimelodella taenioptera*, *Hemisorubim platyrhynchos*, *Pimelodus ornatus*, *Sorubim lima*, *Pseudopimelodus mangurus*).

Associando os resultados da taxonomia tradicional com a técnica molecular, chegou-se à identificação de 48 táxons, sendo que 42 alcançaram resolução taxonômica em nível de espécie (sendo 01 espécie críptica), 04 em nível genérico, 02 em nível de família (Tabela 1). Entre os táxons registrados, 31 ocorreram no Rio Aguapeí, 19 no Rio Verde e 10 no Rio Pardo (Fig. 2). Com relação às famílias, 19 foram representadas, sendo que 17 foram registradas no Rio Aguapeí (das quais 07 ocorreram exclusivamente neste tributário), 11 no Rio Verde e 06 no Rio Pardo (Fig. 3).

Quanto às estratégias reprodutivas, foram registradas 09 espécies migradoras de longas distâncias e 39 não migradoras ou migradoras de curtas distâncias. No tocante à origem, 21 espécies eram não nativas da bacia do Alto Rio Paraná (Tabela 1).

Tabela 1. Táxons de ovos e larvas coletados nos tributários do Reservatório de Porto Primavera e identificados pela associação da taxonomia clássica com a técnica do DNA *Barcoding*. **Taxonomia clássica:** Identificação baseada em características morfométricas e merísticas; **N:** Número de espécimes identificados; **(%):** Porcentagem; **O:** Ovos; **L:** Larvas; **T:** Identificados pela taxonomia clássica; **B:** Identificados pelo DNA *Barcoding*; **ER:** Estratégia reprodutiva, conforme Suzuki et al. (2004); **NM:** Espécie não-migradora ou migradora de curta distância; **M:** Espécie migradora de longas distâncias; **OR:** Origem, conforme Ota et al. (2018); **N:** Nativa; **NN:** Não-nativa.

Identificação taxonômica final	Taxonomia clássica	N	%	Rio Aguapéí		Rio Pardo		Rio Verde		ER	OR
				O	L	O	L	O	L		
CHARACIFORMES											
Anostomidae											
<i>Leporellus vittatus</i>	-	1	0,2						1(B)	NM	N
<i>Leporinus friderici</i>	Anostomidae	127	23,9		1(B)	47(B)	23(B)	34(B)	22(B)	NM	N
<i>Leporinus lacustris</i>	-	1	0,2				1(B)			NM	N
<i>Leporinus tigrinus</i>	-	5	0,9					5(B)		NM	NN
<i>Megaleporinus obtusidens</i>	-	1	0,2					1(B)		M	N
<i>Schizodon borellii</i>	-	3	0,6	1(B)				2(B)		NM	NN
Characidae		1	0,2						1(B)		
<i>Psellogrammus kennedyi</i>	-	1	0,2		1(B)					NM	NN
<i>Aphyocharax dentatus</i>	Characidae	1	0,2		1(B)					NM	NN
<i>Roeboides descavadensis</i>	Characidae	3	0,6		3(B)					NM	NN
<i>Odontostilbe</i> sp.	Characidae	2	0,4		2(B)					NM	
<i>Serrapinus notomelas</i>	-	3	0,6						3(B)	NM	N
Curimatidae											
<i>Cyphocharax gillii</i>	-	3	0,6						3(B)	NM	NN
<i>Steindachnerina brevipinna</i>	<i>Steindachnerina brevipinna</i>	105	19,8		43(B), 62 (T)					NM	NN

Identificação taxonômica final	Taxonomia clássica	N	%	Rio Aguapeí		Rio Pardo		Rio Verde		ER	OR
				O	L	O	L	O	L		
Cynodontidae											
<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	-	8	1,5	5(B)	3(B)					M	N
Erythrinidae											
<i>Hoplias</i> aff. <i>malabaricus</i> (sp1)	<i>Hoplias</i> sp.	3	0,6				1(B)		2(B)	NM	
<i>Hoplias</i> aff. <i>malabaricus</i> (sp2)	<i>Hoplias</i> sp.	6	1,1		6(B)					NM	
<i>Hoplias mbigua</i>	<i>Hoplias</i> sp.	22	4,1		12(B)		9(B)		1(B)	NM	NN
<i>Hoplias misionera</i>	<i>Hoplias</i> sp.	10	1,9		10(B)					NM	NN
Hemiodontidae											
<i>Hemiodus orthonops</i>	-	3	0,6			2(B)		1(B)		NM	NN
Prochilodontidae											
<i>Prochilodus lineatus</i>	<i>Prochilodus lineatus</i>	24	4,5	17(B)	1(B), 6(T)					M	N
Serrasalmidae											
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	-	2	0,4		2(B)			1(B)		NM	
<i>Serrasalmus marginatus</i>	<i>Serrasalmus</i> sp./ <i>Serrasalmus marginatus</i>	18	3,4		12(B)				1(B), 5(T)	NM	NN
GYMNOTIFORMES											
Gymnotidae											
<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	Gymnotiforme	4	0,8		4(B)					NM	N
Rhamphichthyidae											
<i>Rhamphichthys hahni</i>	Gymnotiforme	4	0,8		4(B)					NM	NN

Identificação taxonômica final	Taxonomia clássica	N	%	Rio Aguapéi		Rio Pardo		Rio Verde		ER	OR
				O	L	O	L	O	L		
Sternopygidae											
<i>Eigenmannia</i> sp.	<i>Eigenmannia</i> sp.	16	3,0		16(B)					NM	
<i>Eigenmannia trilineata</i> (sp1)	<i>Eigenmannia</i> sp.	1	0,2		1 (B)					NM	N
<i>Eigenmannia trilineata</i> (sp2)	<i>Eigenmannia</i> sp.	2	0,4		2 (B)					NM	N
SILURIFORMES											
Aspredinidae											
<i>Amaralia oviraptor</i>	-	1	0,2				1(B)			NM	N
Auchenipteridae											
<i>Ageneiosus inermis</i>	<i>Ageneiosus inermis</i>	26	4,9		1(B), 25(T)					NM	NN
<i>Auchenipterus osteomystax</i>	<i>Auchenipterus osteomystax</i>	52	9,8		1(T)		2(B), 42(T)		3(B), 4(T)	NM	NN
<i>Parauchenipterus galeatus</i>	<i>Parauchenipterus galeatus</i>	31	5,8		27(T)		4(T)			NM	NN
<i>Tatia neivai</i>	<i>Tatia neivai</i>	6	1,1						6(B)	NM	N
Callichthyidae											
<i>Corydoras aeneus</i>		1	0,2		1(B)					NM	N
Doradidae											
<i>Pterodoras granulosus</i>	-	8	1,5	8(B)						M	NN
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	-	1	0,2						1(B)	NM	N
Heptapteridae											
<i>Phenacorhamdia tenebrosa</i>	-	1	0,2						1(B)	NM	N
<i>Pimelodella taenioptera</i>	Heptapteridae	6	1,1	1(B)	5(B)					NM	NN

Tabela 2. Táxons identificados pela técnica do DNA *Barcoding* a partir dos ovos e larvas coletados nos tributários do Reservatório de Porto Primavera. **Melhor correspondência:** Táxon com maior similaridade genética no Sistema de Identificação *Boldsystems®*; **BIN:** *Barcode Index Number* atribuído ao táxon de melhor correspondência; **BOLD (%)**: Média das similaridades com o táxon mais próximo no Sistema de Identificação *Boldsystems®*; **EP (%)**: Erro padrão da média; **D (%)**: Média da distância genética dentro do grupo; **DM (%)**: Distância genética máxima dentro do grupo; **N/D**: Não disponibilizado; **N/A**: Não se aplica (apenas um espécime capturado). (*) Táxons que não foram identificados em nível específico baseando-se nos limiares de similaridade com sequências do *BOLD*. (**) Possível complexo de espécies (táxon associado a mais de um *BIN* e distância genética máxima dentro do grupo superior a 1,5%). (***) Imprecisões no banco de dados do *BOLD*.

Identificação taxonômica	Melhor Correspondência	BIN	BOLD ± EP	D ± EP	DM ± EP
CHARACIFORMES					
Anostomidae					
<i>Leporellus vittatus</i>	<i>Leporellus vittatus</i>	AAE5331	100	N/A	N/A
<i>Leporinus friderici</i>	<i>Leporinus friderici</i>	AAC5572	99,99 ± 0,01	0,26 ± 0,12	1,15 ± 0,50
<i>Leporinus lacustris</i>	<i>Leporinus lacustris</i>	Privado	100	N/A	N/A
<i>Leporinus tigrinus</i>	<i>Leporinus tigrinus</i>	Privado	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Megaleporinus obtusidens</i>	<i>Megaleporinus obtusidens</i>	AAB8578	100	N/A	N/A
<i>Schizodon borellii</i>	<i>Schizodon borellii</i>	AAC2254	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Characidae					
Characidae*	<i>Astyanax serratus</i>	ACJ2059	89,31	N/A	N/A
<i>Psellogrammus kennedyi</i>	<i>Psellogrammus kennedyi</i>	AAE0694	100	N/A	N/A
<i>Aphyocharax dentatus</i>	<i>Aphyocharax dentatus</i>	AAO7141	100	N/A	N/A
<i>Roeboides descavadensis</i>	<i>Roeboides descavadensis</i>	AAJ7075	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Odontostilbe</i> sp.*	<i>Odontostilbe microcephala</i>	AA5650	94,64 ± 0,09	0,17 ± 0,16	0,17 ± 0,16
<i>Serrapinus notomelas</i>	<i>Serrapinus notomelas</i>	ACF3905	99,49 ± 0,10	0,34 ± 0,19	0,51 ± 0,30
Curimatidae					
<i>Cyphocharax gillii</i>	<i>Cyphocharax gillii</i>	Privado	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Steindachnerina brevipinna</i>	<i>Steindachnerina brevipinna</i>	AAD8534	99,93 ± 0,02	0,36 ± 0,14	0,79 ± 0,37
Cynodontidae					
<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	AAD5188	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Erythrinidae					
<i>Hoplias</i> aff. <i>malabaricus</i> **	<i>Hoplias intermedius</i> ***	AAI8239/ AAI8240	99,96 ± 0,03	1,98 ± 0,37	4,61 ± 0,84
<i>Hoplias mbigua</i>	<i>Hoplias mbigua</i>	ACO5223	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Hoplias misionera</i>	<i>Hoplias malabaricus</i> ***	AAB1732	99,73 ± 0,05	0,16 ± 0,09	0,48 ± 0,26
Hemiodontidae					
<i>Hemiodus orthonops</i>	<i>Hemiodus orthonops</i>	N/D	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Identificação taxonômica	Melhor Correspondência	BIN	BOLD ± EP	D ± EP	DM ± EP
Prochilodontidae					
<i>Prochilodus lineatus</i>	<i>Prochilodus lineatus</i>	ADK5931	99,96 ± 0,02	0,24 ± 0,10	0,51 ± 0,30
Serrasalminidae					
Serrasalminidae*	<i>Serrasalmus rhombeus</i>	AAC7587	99,00	N/A	N/A
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	AAD6423	99,90 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Serrasalmus marginatus</i>	<i>Serrasalmus marginatus</i>	AAC7587	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
GYMNOTIFORMES					
Gymnotidae					
<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	ACG7331	99,69 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Rhamphichthyidae					
<i>Rhamphichthys hahni</i>	<i>Rhamphichthys hahni</i>	AAE3328	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Sternopygidae					
<i>Eigenmannia sp.*</i>	<i>Eigenmannia trilineata</i>	AAD9492	96,68	N/A	N/A
<i>Eigenmannia trilineata**</i>	<i>Eigenmannia trilineata</i>	AAD9492/ ABW1951	99,85 ± 0,04	1,21 ± 0,22	4,43 ± 0,88
SILURIFORMES					
Aspredinidae					
<i>Amaralia oviraptor</i>	<i>Amaralia oviraptor</i>	ACX3883	99,48	N/A	N/A
Auchenipteridae					
<i>Ageneiosus inermis</i>	<i>Ageneiosus inermis</i>	AAC6222	100	N/A	N/A
<i>Auchenipterus osteomystax</i>	<i>Auchenipterus osteomystax</i>	ACE8553	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Callichthyidae					
<i>Corydoras aeneus</i>	<i>Corydoras aeneus</i>	ACF5135	99,77	N/A	N/A
Doradidae					
<i>Pterodoras granulosus</i>	<i>Pterodoras granulosus</i>	AAD9737	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	AAI0451	100	N/A	N/A
Heptapteridae					
<i>Phenacorhamdia tenebrosa</i>	<i>Phenacorhamdia tenebrosa</i>	AAD2018	100	N/A	N/A
<i>Pimelodella taenioptera</i>	<i>Pimelodella taenioptera</i>	N/D	99,83 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Pimelodella gracilis</i>	<i>Pimelodella gracilis</i>	ABZ3426	99,74 ± 0,08	0,51 ± 0,27	0,51 ± 0,28
<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	N/D	98,95 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Identificação taxonômica	Melhor Correspondência	BIN	BOLD ± EP	D ± EP	DM ± EP
Pimelodidae					
<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	ACX3952	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Iheringichthys labrosus</i>	<i>Iheringichthys labrosus</i>	AAE2664	100	N/A	N/A
<i>Pimelodus ornatus</i>	<i>Pimelodus ornatus</i>	ACY8631	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	AAD0242	100	N/A	N/A
<i>Sorubim lima</i>	<i>Sorubim lima</i>	ACG7167	100	N/A	N/A
Pseudopimelodidae					
<i>Pseudopimelodus mangurus</i>	<i>Pseudopimelodus mangurus</i>	AAD9623	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

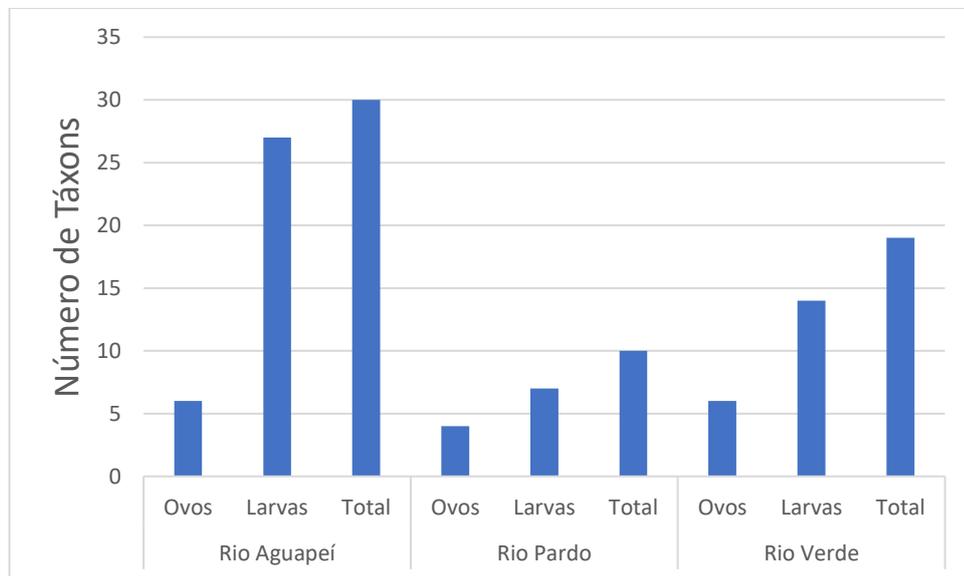


Figura 2. Número de táxons compondo o ictioplâncton de cada tributário do Reservatório de Porto Primavera no período de estudo.

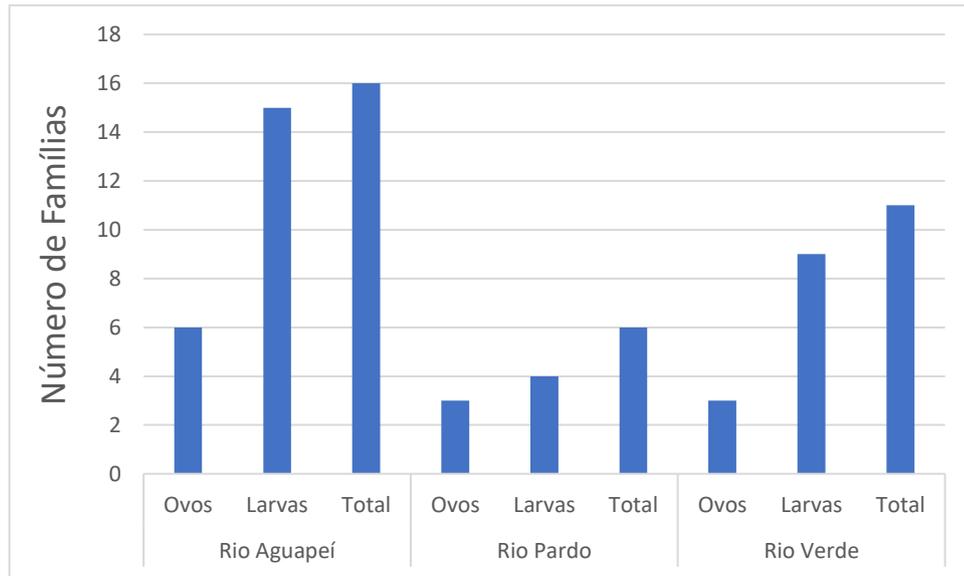


Figura 3. Número de famílias compondo o ictioplâncton de cada tributário do Reservatório de Porto Primavera no período de estudo.

Empregando-se os limiares de similaridade, alguns táxons não puderam ser identificados em nível específico, como foi o caso de *Eigenmannia* sp., *Odontostilbe* sp. (nível genérico), um caracádeo e um serrasalmídeo (nível de família).

No caso do gênero *Hoplias*, a construção da árvore *Neighbor-Joining* (Fig. 4) e as distâncias genéticas observadas (Tabela 3) revelaram imprecisões no banco de dados do *BOLD*. Assim, espécimes que pela abordagem de limiares de similaridade seriam identificados como *Hoplias intermedius* foram reclassificados como duas possíveis espécies de *Hoplias* aff. *malabaricus*. O mesmo se passou com espécimes classificados *a priori* como *Hoplias malabaricus*, que tiveram sua identificação retificada para *Hoplias misionera* (Fig. 4).

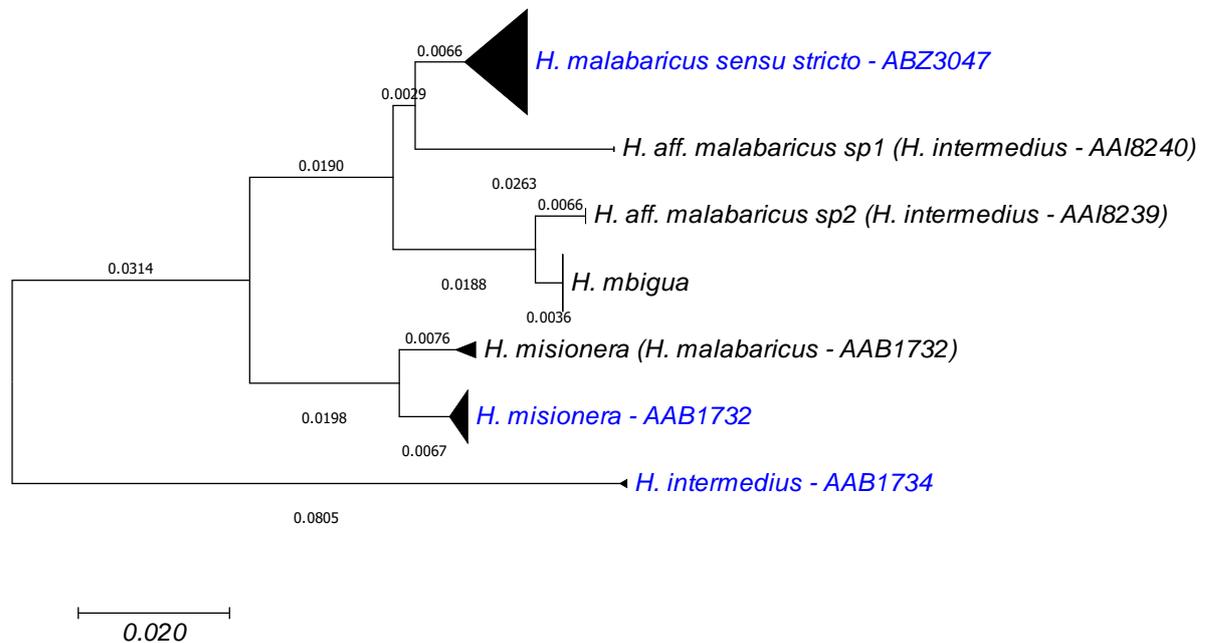


Figura 4. Relação evolutiva entre linhagens de *Hoplias* coletadas (em preto) e sequências do banco de dados do *BOLD* (em azul), acompanhadas de seu respectivo *BIN*. Os táxons entre parênteses referem-se à identificação inicial (imprecisa), realizada antes da análise das distâncias genéticas. A árvore foi desenhada em escala, com o comprimento dos ramos na mesma proporção das distâncias evolutivas usadas para inferir as distâncias filogenéticas. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método K2-P e foram medidas em “número de substituição de bases por sítio”. Ao todo, 590 posições compuseram o conjunto de dados analisados.

Tabela 3. Distância genética (Kimura 2-Parâmetros) \pm erro padrão entre linhagens de *Hoplias* coletadas. A diagonal principal (em negrito), mostra valores de distância genética dentro dos grupos.

	1	2	3	4
1- <i>H. aff. malabaricus</i> (sp1)	0,00% \pm 0,00			
2- <i>H. aff. malabaricus</i> (sp2)	4,66% \pm 0,86	0,00% \pm 0,00		
3- <i>H. mbigua</i>	4,83% \pm 0,87	1,13% \pm 0,43	0,00% \pm 0,00	
4- <i>H. misionera</i>	7,88% \pm 1,13	6,96% \pm 1,09	6,78% \pm 1,06	0,16% \pm 0,09

A associação com dois *BINs* distintos, a formação de dois *clusters* na árvore *Neighbor-Joining* (Fig. 5) e os valores de distância genética (Tabela 4) revelaram a existência de duas unidades taxonômicas operacionais para espécimes inicialmente identificados como uma única espécie (*Eigenmannia trilineata*).

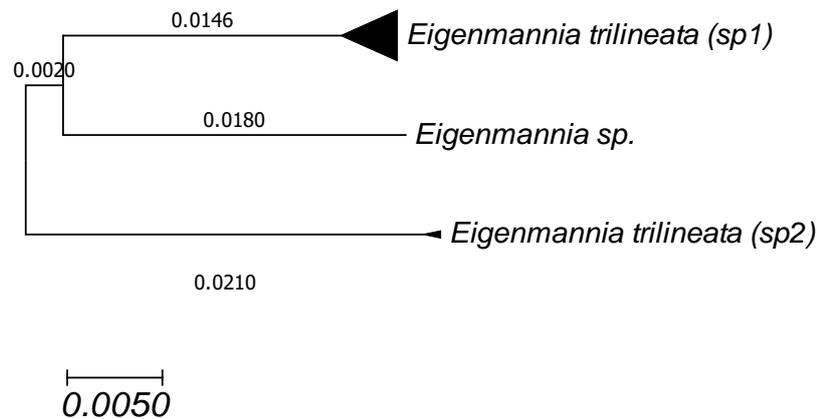


Figura 5. Relação evolutiva entre linhagens de *Eigenmannia* coletadas. A árvore foi desenhada em escala, com o comprimento dos ramos na mesma proporção das distâncias evolutivas usadas para inferir as distâncias filogenéticas. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método K2-P e foram medidas em “número de substituição de bases por sítio”. Ao todo, 637 posições compuseram o conjunto de dados analisados

Tabela 4. Distância genética (Kimura 2-Parâmetros) \pm erro padrão entre linhagens de *Eigenmannia* coletadas. A diagonal principal (em negrito), mostra valores de distância genética dentro dos grupos. N/A: Não se aplica (apenas um indivíduo coletado).

	1	2	3
1- <i>E. trilineata</i> (sp1)	0,32% \pm 0,11		
2- <i>E. trilineata</i> (sp2)	4,12% \pm 0,81	0,16% \pm 0,15	
3- <i>Eigenmannia</i> sp.	3,55% \pm 0,72	4,17% \pm 0,82	N/A

4 DISCUSSÃO

4.1 Associando metodologias

Associando-se as duas metodologias para a identificação do ictioplâncton (classificação taxonômica baseada na morfologia e no DNA *Barcoding*), alcançou-se uma resolutividade em nível específico de 87,5%, que é inferior à obtida por trabalhos desenvolvidos em outros trechos da bacia, que chegaram a 99,71% (Frantine-Silva et al., 2015) e 100% (Almeida et al., 2018). Isso se deve à captura de espécies cujas sequências do gene COI ainda não foram inseridas nos bancos de dados ou foram inseridas com informações imprecisas, seja por equívocos ou por ainda não terem sido morfologicamente descritas em nível específico, como é o caso de muitas espécies do gênero *Hoplías* (Cardoso et al., 2018).

A metodologia tradicional de identificação se mostrou útil para a identificação de um número considerável de larvas em nível específico (n=184), número próximo ao registrado para larvas identificadas neste mesmo nível pela técnica de DNA *Barcoding* (n=187). Assim, quando a descrição das fases iniciais de desenvolvimento encontra-se disponível na literatura, como

ocorre para parte das espécies de peixe da bacia do Alto Rio Paraná (Nakatani et al., 2001; Orsi et al., 2016), a utilização preliminar da metodologia clássica resulta na diminuição do tempo e dos custos da identificação do ictioplâncton, mesmo quando se utiliza a técnica molecular de maneira complementar.

Além disso, análises morfológicas prévias também permitem a identificação em nível genérico e/ou a discriminação de morfotipos (Frantine-Silva et al., 2015), orientando a realização de subamostragens que visam reduzir a quantidade de material a ser encaminhado para análise molecular (é comum a captura de um expressivo número de indivíduos da mesma espécie em coletas realizadas no mesmo período e ponto amostral; Gogola et al., 2013; Reynalte-Tataje et al., 2013).

A utilização subsequente da técnica de DNA *Barcoding* como uma ferramenta para o estudo do ictioplâncton possibilitou o aumento expressivo de 311% no número de espécies identificadas em relação ao número registrado inicialmente pela metodologia tradicional (de 09 para 37 espécies). Ademais, esta técnica possibilitou a identificação de ovos, cujas características morfológicas são pouco informativas (Becker et al. 2015) e, portanto, não são identificados na maioria dos estudos (Hermes-Silva et al., 2009; Reynalte-Tataje et al., 2012; Rosa et al., 2018). Estudando o ictioplâncton na mesma região, mas contemplando mais sítios amostrais (17) e um maior período amostral (3 estações reprodutivas), Da Silva et al. (2019) identificaram um número inferior de táxons em nível específico (26) ao realizar apenas a identificação taxonômica tradicional.

O DNA *Barcoding* também possibilitou a identificação de larvas com poucos caracteres diagnósticos, como larvas recém-eclodidas ou danificadas, bem como de espécimes cujas características diagnósticas são compartilhadas entre diferentes táxons relacionados, como é o caso das larvas das famílias Anostomidae e Characidae (Nakatani et al., 2001).

4.2 Particularidades na identificação molecular

Embora os limiares estabelecidos para identificação do ictioplâncton não tenham sido arbitrários, uma vez que se aproximam das divergências genéticas médias dentro de espécies (1,3%) e gêneros (6,8%) observadas para a ictiofauna do Alto Rio Paraná (Pereira et al. 2013) e já haviam sido utilizados com sucesso por Almeida et al. (2018) (100% de eficiência na identificação do ictioplâncton em nível específico), no presente estudo, cerca de 20% dos táxons

não foram identificados de forma direta e inequívoca em nível de espécie apenas utilizando as similaridades com o banco de dados do *BOLD*.

Assim, a identificação de alguns grupos taxonômicos necessitou de análises envolvendo tanto distâncias genéticas, como relações filogenéticas. Este foi o caso de alguns espécimes do gênero *Hoplias*. Considerando apenas as similaridades com sequências do *BOLD*, por exemplo, espécimes coletados nos tributários do reservatório de Porto Primavera teriam sido identificados em nível específico como *H. malabaricus* e *H. intermedius*, devido a imprecisões no banco de dados.

O gênero *Hoplias* é morfológicamente subdividido em três grupos (*H. aimara*, *H. malabaricus* e *H. lacerdae*; Oyakawa, 1990; Oyakawa & Mattox, 2009), que correspondem a um complexo de espécies. O grupo *H. malabaricus* apresenta 15 unidades taxonômicas operacionais conhecidas (Cardoso et al., 2018), uma delas sendo a espécie *H. malabaricus*, que tem como localidade-tipo o Suriname (Mol et al., 2012). A bacia do Rio Paraná abriga sete destas UTOs (Cardoso et al., 2018), das quais apenas três (*H. mbigua*, *H. argentinensis* e *H. misionera*) foram morfológicamente descritas recentemente (Azpelicueta et al., 2015; Rosso et al., 2016, 2018).

Os espécimes deste estudo inicialmente identificados como *H. malabaricus*, por apresentarem correspondência mais alta ($99,73\% \pm 0,05$) com indivíduos assim identificados no *BOLD*, possuem distância genética de 7,0% em relação às sequências de *H. malabaricus* da localidade-tipo (*BIN* ABZ3047). Além disso, as sequências de “*H. malabaricus*” com as quais apresentaram correspondência são associadas ao *BIN* AAB1732, o mesmo atribuído à espécie *H. misionera*. Na árvore *Neighbor-Joining*, as sequências dos espécimes coletados agruparam-se com sequências de *H. misionera*, e a divergência genética média entre elas foi de 1,8%. *Hoplias misionera* tem uma identidade molecular robusta, com distância intra-*BIN* máxima de 3,54% e mínima de 5,3% de sua congênera mais próxima (*H. malabaricus sensu stricto*, *BIN* ABZ3047). Sua distribuição geográfica na América do Sul é bastante ampla, agrupando sequências do Alto e Baixo Rio Paraná, do Rio Paraguai e do Rio Amazonas (Cardoso et al. 2018), o que justifica a elevada divergência genética intra-*BIN*. Assim, os espécimes *a priori* identificados como *H. malabaricus* (por inconsistências no *BOLD*) passaram a ser identificados como *H. misionera* no presente trabalho.

Algumas larvas neste estudo também foram inicialmente identificadas como *H. intermedius*, devido a sua similaridade ($99,96\% \pm 0,03$) com sequências identificadas como

pertencendo a esta espécie (*BINs* AAI8239 e AAI8240). *Hoplias intermedius* é uma das espécies do grupo *Hoplias lacerdae* e se distribui nos rios São Francisco, Doce e Alto Paraná (Oyakawa & Mattox, 2009). Ao contrário do esperado, em vez de se agruparem às sequências de *H. intermedius* da localidade-tipo (grupo *H. lacerdae*, *BIN* AAB1734), os espécimes coletados se agruparam às espécies do grupo *H. malabaricus*, na árvore *Neighbor-Joining*. Além disso, foram separados em dois *clusters* distintos, com distância genética média de 4,6%, evidenciando se tratarem de duas UTOs diferentes. Assim, confirmada a imprecisão no banco de dados já constatada por Cardoso et al. (2018), estes espécimes passaram a ser identificados como *Hoplias* aff. *malabaricus* (sp1) e *Hoplias* aff. *malabaricus* (sp2) no presente trabalho.

Estudos recentes têm confirmado a existência de mais de uma unidade taxonômica entre espécimes morfológicamente identificados como *Eigenmannia trilineata* (Araya-Jaime et al., 2017; Shimabukuro-Dias et al., 2017). No presente trabalho, larvas identificadas como *Eigenmannia trilineata* pelos limiões adotados apresentaram distância genética máxima de 4,4% entre si e foram associados a dois *BINs* diferentes (AAD9492 e ABW1951). Na árvore *Neighbor-Joining*, foram agrupados em *clusters* distintos, sugerindo se tratarem de duas espécies identificadas morfológicamente como uma única (espécies crípticas). Por conseguinte, foram identificados como dois táxons distintos: *E. trilineata* (sp1), que apresentou similaridade média de 99,86% com sequências associadas ao *BIN* AAD9492, e *E. trilineata* (sp2), que apresentou similaridade de 100% com sequências associadas ao *BIN* ABW1951. Ainda foi identificada uma terceira unidade taxonômica como pertencente ao gênero *Eigenmannia* (similaridade de 96,68% com *Eigenmannia trilineata* – *BIN* AAD9492).

A detecção de diferentes UTOs para uma mesma espécie revela que a diversidade de peixes conhecida na bacia do Alto Rio Paraná pode estar subestimada. Assim, gêneros como *Eigenmannia* e *Hoplias* precisam de um esforço envolvendo o emprego de diferentes técnicas analíticas (cariotípicas, moleculares, morfológicas; Souza-Shibatta et al., 2013) para a detecção e descrição de novas espécies.

Os limiões de similaridade também não foram suficientes para a precisa identificação de uma larva de serrasalmídeo coletada no Rio Verde que, embora tenha apresentado correspondência dentro dos limites que lhe garantiriam identificação em nível específico (99% de similaridade com sequência de *Serrasalmus rhombeus*), foi classificada taxonomicamente apenas em nível de família (Serrasalmidae). *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1766) é uma espécie nativa das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, de rios do Escudo das Guianas e rios costeiros do nordeste do Brasil (Jegu & Ingenito, 2007) e não há registros de sua ocorrência na

bacia do Alto Rio Paraná (Langeani et al. 2007; Ota et al. 2018), o que constitui um indicativo de que associar esta espécie à larva coletada seria um equívoco. Além disso, estudo realizado com mais de mil DNA *barcodes* de serrasalmídeos da região neotropical revelou que a média das divergências máximas intraespecíficas nesta família é de 0,68% (Machado et al. 2018), um percentual abaixo do limiar estabelecido para identificação específica no presente estudo (1,5%) e também inferior à distância genética entre o espécime coletado e a sequência de *S. rhombeus* (1%). Ademais, a larva também apresentou similaridades elevadas com espécies de outros gêneros (similaridade de 98,92% com *Pygocentrus nattereri*, 98,90% com *Mylossoma duriventre*, 98,86% com *Myleus setiger* e 98,72% com *Serrasalmus marginatus*). Esta dificuldade na identificação pode estar relacionada a lacunas nos bancos de dados do *BOLD* e *Genbank*, bem como à limitação que o estabelecimento de limiares de similaridade com sequências *barcodes* apresentam para a identificação de espécies de irradiação muito recente (Monaghan et al., 2006; Machado et al. 2018).

4.3 Composição taxonômica do ictioplâncton

O número de táxons identificados (48) foi superior ao observado por Frantine-Silva et al. (2015) em um estudo pioneiro utilizando DNA *Barcoding* para a identificação do ictioplâncton em ecossistemas de água doce neotropicais (bacia do Rio Paranapanema), que, mesmo tendo avaliado número maior de sítios amostrais (07) e ambientes com características hidrológicas diferentes (lóticos e semi-lênticos), registrou 37 espécies.

Entre os táxons registrados, foram identificadas nove espécies migradoras de longas distâncias (*Megaleporinus obtusidens*, *Rhaphiodon vulpinus*, *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Pterodoras granulosus*, *Hemisorubim platyrhynchos*, *Pimelodus ornatus*, *Pseudoplatystoma corruscans* e *Sorubim lima*). Da Silva (2015) já havia demonstrado a importância dos tributários do Reservatório de Porto Primavera para a reprodução de peixes com essa estratégia reprodutiva, reconhecidamente os mais impactados em bacias fragmentadas (Agostinho et al., 2016), como é o caso da bacia do Alto Rio Paraná. O presente trabalho ainda melhorou a resolutividade taxonômica em relação a trabalhos anteriores (Da Silva et al., 2015; 2019), identificando pela primeira vez em nível específico espécimes possivelmente já coletados, mas identificados em nível taxonômico superior (gênero e família), como foi o caso de *Megaleporinus obtusidens*, *Piaractus mesopotamicus* e *Pimelodus ornatus*.

As espécies não-nativas representaram 50% das espécies registradas, um percentual bastante elevado e semelhante ao observado por Almeida et al. (2018) na região do Reservatório de Rosana (40,16%), próximo à confluência do Rio Paranapanema com o Rio Paraná. A ictiofauna que atualmente compõem os reservatórios de Porto Primavera e Rosana, assim como seus tributários, resulta de uma combinação das espécies das províncias ictiofaunísticas do Baixo e Alto Rio Paraná, que ocorreu em decorrência da formação do reservatório da Usina Hidrelétrica (UHE) de Itaipu. Este reservatório, localizado a jusante de Porto Primavera, inundou a barreira geográfica (Salto de Sete Quedas) que separava as duas ecorregiões, resultando numa invasão massiva do Alto Rio Paraná por espécies do Baixo Rio Paraná (Júlio Júnior et al., 2009; Vitule et al., 2012). A operação de uma passagem para peixes na UHE Itaipu, conhecida como “Canal da Piracema”, tem possibilitado a invasão do Alto Rio Paraná por outras espécies ao longo do tempo, como *Hemiodus orthonops* (Agostinho et al., 2014), registrado no presente estudo em sua fase embrionária, nos rios Pardo e Verde. Também foi registrada, no Rio Verde, a presença de larvas da espécie não-nativa *Cyphocharax gillii*, o que corresponde ao primeiro registro desta espécie para a bacia do Alto Rio Paraná. Com exceção de *Leporinus tigrinus*, que é nativa da bacia dos Rios Tocantins-Araguaia (Britski & Garavello, 2007), todas as demais espécies não-nativas que compuseram o ictioplâncton nos tributários do reservatório de Porto Primavera são migrantes do Baixo Rio Paraná (Júlio Júnior et al., 2009; Ota et al., 2018).

Espécies exóticas são a principal causa de extinções entre os vertebrados (Bellard et al., 2016), podendo impactar a ictiofauna nativa por meio da competição por recursos, predação, alterações do habitat, introdução de patógenos e parasitas e alterações genéticas (Mack et al., 2000; Agostinho et al., 2007). No Alto Rio Paraná, espécies não-nativas têm sido apontadas como responsáveis pelo decréscimo populacional de espécies filogeneticamente relacionadas, com hábitos alimentares e reprodutivos semelhantes (Gois et al., 2015, Rodrigues et al., 2018). Apesar dos impactos causados por essas espécies serem difíceis de prever, a rápida detecção do estabelecimento de invasores (ainda no estágio embrionário) possibilitada pelo DNA *Barcoding* pode ser crucial para a adoção de estratégias de manejo mais adequadas e efetivas para seu controle.

A associação da taxonomia tradicional e da técnica do DNA *Barcoding* mostrou-se capaz de identificar com sucesso a maioria dos ovos e larvas coletados, de modo que os resultados aqui obtidos podem ser utilizados para nortear a elaboração de planos de manejo e estratégias de conservação da ictiofauna na bacia do Alto Rio Paraná. A identificação

morfológica preliminar do ictioplâncton otimizou o processo e orientou a subamostragem do material a ser submetido a análises moleculares, enquanto o DNA *Barcoding* melhorou expressivamente a resolutividade taxonômica e indicou quais grupos devem ser alvo de estudos complementares para eventual detecção e descrição de novas espécies (espécies crípticas).

Os resultados também evidenciaram a necessidade de se ampliar a biblioteca de sequências *barcode*, de modo a abarcar espécies que ainda não tiveram seu gene COI sequenciado e depositado nos bancos de dados. Lacunas e imprecisões na base de dados, bem como a baixa divergência genética interespecífica observada em peixes neotropicais, representaram uma dificuldade para a identificação de alguns táxons pela abordagem baseada em limiares de similaridade genética.

Embora não tenha sido o objetivo do presente estudo, a associação das análises morfológicas e moleculares pode possibilitar a descrição das características morfométricas e morfológicas de espécies ainda não descritas em seus estágios iniciais de desenvolvimento, o que culminaria no avanço da taxonomia tradicional e contribuiria para sua melhor resolutividade.

Por fim, o presente estudo reforça a relevância dos tributários do Reservatório de Porto Primavera para a conservação da ictiodiversidade, provendo rotas migratórias e sítios de desova e desenvolvimento inicial para espécies que necessitam de trechos lóticos e diferentes habitats para completar seu ciclo de vida. Esta importância se acentua pelo fato da bacia do Alto Rio Paraná ser a mais impactada por empreendimentos hidrelétricos na região neotropical e por seus poucos trechos livres ainda serem foco da instalação de novos empreendimentos.

5 REFERÊNCIAS

- Agostinho, A. A., L. C. Gomes, & F. M. Pelicice, 2007. Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil. Eduem, Maringá.
- Agostinho, A. A., L. C. Gomes, N. C. L. Santos, J. C. G. Ortega, & F. M. Pelicice, 2016. Fish assemblages in Neotropical reservoirs: Colonization patterns, impacts and management. *Fisheries Research Elsevier B.V.* 173: 26–36.
- Agostinho, A. A., H. I. Suzuki, R. Fugui, D. C. Alves, L. H. Tonella, & L. A. Espindola, 2014. Ecological and life history traits of *Hemiodus orthonops* in the invasion process: looking for clues at home. *Hydrobiologia* 746: 415–430.
- Agostinho, A., F. Pelicice, & L. Gomes, 2008. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Brazilian Journal of Biology* 68: 1119–1132.
- Ahlstrom, E. H., & H. G. Moser, 1976. Eggs and larvae of fishes and their role in systematic investigations and in fisheries. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 40: 379–398.
- ANEEL, 2019. BIG – Banco de Informações de Geração. Disponível em <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.cfm>
- Almeida, F. S., W. Frantine-Silva, S. C. Lima, D. A. Z. Garcia, & M. L. Orsi, 2018. DNA barcoding as a useful tool for identifying non-native species of freshwater ichthyoplankton in the neotropics. *Hydrobiologia* 817: 111–119.
- Araya-Jaime, C., N. T. B. Mateussi, R. Utsunomia, G. J. Costa-Silva, C. Oliveira, & F. Foresti, 2017. ZZ/Z0: The New System of Sex Chromosomes in *Eigenmannia* aff. *trilineata* (Teleostei: Gymnotiformes: Sternopygidae) Characterized by Molecular Cytogenetics and DNA Barcoding. *Zebrafish* 14: 464–470.
- Azpelicueta, M. de las M., M. F. Benítez, D. R. Aichino, & C. M. D. Mendez, 2015. A new species of the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae), a tararira from the lower Paraná River, in Misiones, Argentina. *Acta zoológica liloana* 59: 71–82.
- Barletta, M., A. J. Jaureguizar, C. Baigun, N. F. Fontoura, A. A. Agostinho, V. M. F. Almeida-Val, A. L. Val, R. A. Torres, L. F. Jimenes-Segura, T. Giarrizzo, N. N. Fabré, V. S. Batista, C. Lasso, D. C. Taphorn, M. F. Costa, P. T. Chaves, J. P. Vieira, & M. F. M. Corrêa, 2010. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of Fish Biology* 76: 2118–176.
- Becker, R. A., N. G. Sales, G. M. Santos, G. B. Santos, & D. C. Carvalho, 2015. DNA barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the Upper Paraná and São Francisco. *Journal of Fish Biology* 87: 159–168.
- Bellard, C., P. Cassey, & T. M. Blackburn, 2016. Alien species as a driver of recent extinctions. *Biology Letters* 12: 20150623.
- Britski, H. A., & J. C. Garavello, 2007. Família Anostomidae In Buckup, P. A., N. A. Menezes, & M. S. Ghazzi (eds), *Catálogo das espécies de peixe de água doce do Brasil*. Museu Nacional - UFRJ, Rio de Janeiro: 195.
- Cardoso, Y. P., J. J. Rosso, E. Mabragaña, M. González-Castro, M. Delpiani, E. Avigliano, S. Bogan, R. Covain, N. F. Schenone, & J. M. D. Astarloa, 2018. A continental-wide molecular

approach unraveling mtDNA diversity and geographic distribution of the Neotropical genus *Hoplias*. *PLOS ONE* 13: e0202024.

Carolsfeld, J., B. Harvey, C. Ross, & A. Baer, 2003. *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust, Victoria, Canada.

Celestino, L. C., F. J. Sanz-Ronda, L. E. Miranda, M. C. Makrakis, J. H. P. Dias, & S. Makrakis, 2019. Bidirectional connectivity via fish ladders in a large Neotropical river. *River Research and Applications* 1-11.

Da Silva, P. S., M. C. Makrakis, L. E. Miranda, S. Makrakis, L. Assumpção, S. Paula, J. H. P. Dias, & H. Marques, 2015. Importance of reservoir tributaries to spawning of migratory fish in the Upper Paraná river. *River Research and Applications* 31: 313–322.

Da Silva, P. S., L. E. Miranda, S. Makrakis, L. Assumpção, J. H. P. Dias, & M. C. Makrakis, 2019. Tributaries as biodiversity preserves: an ichthyoplankton perspective from the severely impounded Upper Paraná River. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 29: 258-269.

Frantine-Silva, W., S. H. Sofia, M. L. Orsi, & F. S. Almeida, 2015. DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular Ecology Resources* 15: 1226–1237.

Gao, Y., B. Wang, X. Liu, Y. Wang, J. Zhang, Y. Jiang, & F. Wang, 2013. Impacts of river impoundment on the riverine water chemistry composition and their response to chemical weathering rate. *Frontiers of Earth Science* 7: 351–360.

Gogola, T. M., P. V Sanches, É. A. Gubiani, & P. R. L. Silva, 2013. Spatial and temporal variations in fish larvae assemblages of Ilha Grande National Park, Brazil. *Ecology of Freshwater Fish* 22: 95–105.

Gois, K. S., F. M. Pelicice, L. C. Gomes, & A. A. Agostinho, 2015. Invasion of an Amazonian cichlid in the Upper Parana River: facilitation by dams and decline of a phylogenetically related species. *Hydrobiologia* 746: 401–413.

Graf, W. L., 2006. Downstream hydrologic and geomorphic effects of large dams on American rivers. *Geomorphology* 79: 336–360.

Gutfreund, C., S. Makrakis, T. Castro-Santos, L. F. Celestino, J. H. P. Dias, & M. C. Makrakis, 2018. Effectiveness of a fish ladder for two Neotropical migratory species in the Paraná River. *Marine and Freshwater Research* 69: 1848–1856.

Havel, J. E., C. E. Lee, & J. M. Vander Zanden, 2005. Do Reservoirs Facilitate Invasions into Landscapes? *BioScience* 55:518-525.

Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, & J. R. DeWaard, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270: 313–321.

Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham, & J. R. DeWaard, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences (Suppl.)* 270: S96–S99.

- Hermes-Silva, S., D. Reynalte-Tataje, & E. Zaniboni-Filho, 2009. Spatial and Temporal Distribution of Ichthyoplankton in the Upper Uruguay River, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 933–944.
- Hoeinghaus, D. J., A. A. Agostinho, L. C. Gomes, F. M. Pelicice, E. K. Okada, J. D. Latini, E. A. L. Kashiwaqui, & K. O. Winemiller, 2009. Effects of river impoundment on ecosystem services of large tropical rivers: Embodied energy and market value of artisanal fisheries. *Conservation Biology* 23: 1222–1231.
- Hofmann, T., T. Knebelsberger, M. Kloppmann, J. Ulleweit, & M. J. Raupach, 2017. Egg identification of three economical important fish species using DNA barcoding in comparison to a morphological determination. *Journal of Applied Ichthyology* 33: 1–8.
- Hubert, N., B. Espiau, C. Meyer, & S. Planes, 2015. Identifying the ichthyoplankton of a coral reef using DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources* 15: 57–67.
- Jegu, M., & L. F. da S. Ingenito, 2007. Família Characidae: Serrasalminae In Buckup, P. A., N. A. Menezes, & M. S. Ghazzi (eds), *Catálogo das espécies de peixe de água doce do Brasil*. Museu Nacional - UFRJ, Rio de Janeiro: 195.
- Júlio Júnior, H. F., C. D. Tós, A. A. Agostinho, & C. S. Pavanelli, 2009. A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology* 7: 709–718.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
- Ko, H.L., Y.T. Wang, T.S. Chiu, M.A. Lee, M.Y. Leu, K.Z. Chang, W.Y. Chen, & K.T. Shao, 2013. Evaluating the Accuracy of Morphological Identification of Larval Fishes by Applying DNA Barcoding. *PLOS ONE* 8: 3–9.
- Kumar, S., G. Stecher, & K. Tamura, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.
- Langeani, F., R. M. C. Castro, O. T. Oyakawa, O. A. Shibatta, C. S. Pavanelli, & L. Casatti, 2007. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica* 7: 181–197.
- Lees, A. C., C. A. Peres, P. M. Fearnside, M. Schneider, & J. A. S. Zuanon, 2016. Hydropower and the future of Amazonian biodiversity. *Biodiversity and Conservation* 25: 451–466.
- Leyva-Cruz, E., L. Vásquez-Yeomans, L. Carrillo, & M. Valdez-Moreno, 2016. Identifying pelagic fish eggs in the southeast Yucatan Peninsula using DNA barcodes. *Genome* 59: 1117–1129.
- Ligon, F. K., W. E. Dietrich, & W. J. Trush, 1995. Downstream Ecological Effects of Dams. *BioScience* 45: 183–192.
- Machado, V. N., R. A. Collins, R. P. Ota, M. C. Andrade, I. P. Farias, & T. Hrbek, 2018. One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. *Scientific Reports* 8:8387.

- Mack, R. N., D. Simberloff, W. M. Lonsdale, H. Evans, M. Clout, & F. Bazzaz, 2000. Biotic Invasions: Causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10: 689–710.
- Makrakis, M. C., L. E. Miranda, S. Makrakis, H. M. Fontes Júnior, W. G. Morlis, J. H. P. Dias, & J. O. Garcia, 2012. Diversity in migratory patterns among Neotropical fishes in a highly regulated river basin. *Journal of Fish Biology* 81: 866–881.
- Martinet, J., P. Guédant, & S. Descloux, 2016. Phytoplankton community and trophic status assessment of a newly impounded sub-tropical reservoir: case study of the Nam Theun 2 Reservoir (Lao PDR, Southeast Asia). *Hydroécologie Appliquée* 19: 173–195.
- Mol, J. H., R. P. Vari, R. Covain, P. W. Willink, & S. Fisch-muller, 2012. Annotated checklist of the freshwater fishes of Suriname. *Cybio* 36: 263–292.
- Monaghan, M. T., M. Balke, J. Pons, & A. P. Vogler, 2006. Beyond barcodes: complex DNA taxonomy of a South Pacific Island radiation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 273: 887–893.
- Nakatani, K., A. A. Agostinho, A. Bialezki, G. Baumgartner, P. V. Sanches, M. C. Makrakis, & C. Pavanelli, 2001. Manual de identificação de ovos e larvas de peixes brasileiros de água doce. EDUEM, Maringá.
- Nabi, G., M. Amin, N. Ullah, & N. Ahmed, 2014. An over view on the causes, types and role of hormones in fish migration. 5: 404–412.
- Nilsson, C., C. A. Reidy, M. Dynesius, & C. Revenga, 2005. Fragmentation and Flow Regulation of the World's Large River Systems. *Science* 308: 405–408.
- Orsi, M. L., F. S. Almeida, A. C. Swarça, A. Claro-García, N. C. Vianna, D. A. Z. Garcia, & A. Bialezki (eds), 2016. Ovos, larvas e juvenis dos peixes da bacia do rio Paranapanema. Triunfal Gráfica e Editora, Assis.
- Ota, R. R., G. C. Deprá, W. J. Graça, & C. S. Pavanelli, 2018. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated. *Neotropical Ichthyology* 16: 1–111.
- Oyakawa, O. T., 1990. Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo lacerdae) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil (Teleostei: Erythrinidae). Universidade de São Paulo.
- Oyakawa, O. T., & G. M. T. Mattox, 2009. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. *Neotropical Ichthyology* 7: 117–140.
- Pelicice, F. M., V. M. Azevedo-Santos, J. R. S. Vitule, M. L. Orsi, D. P. Lima Junior, A. L. B. Magalhães, P. S. Pompeu, M. Petrere, & A. A. Agostinho, 2017. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. *Fish and Fisheries* 18: 1119–1133.
- Pereira, L. H. G., R. Hanner, F. Foresti, & C. Oliveira, 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BioMed Central Genetics* 14: 1–14.
- Ratnasingham, S., & P. D. N. Hebert, 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364.

- Ratnasingham, S., & P. D. N. Hebert, 2013. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLOS ONE* 8: e66213.
- Reis, R. E., J. S. Albert, F. Di Dario, M. M. Mincarone, P. Petry, & L. A. Rocha, 2016. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of fish biology* 89: 12–47
- Reynalte-Tataje, D. A., A. A. Agostinho, & A. Bialecki, 2013. Temporal and spatial distributions of the fish larval assemblages of the Ivinheima River sub-basin (Brazil). *Environmental Biology of Fishes* 96: 811–822.
- Reynalte-Tataje, D. A., E. Zaniboni-Filho, A. Bialecki, & A. A. Agostinho, 2012. Temporal variability of fish larvae assemblages: Influence of natural and anthropogenic disturbances. *Neotropical Ichthyology* 10: 837–846.
- Rodrigues, A. C., H. S. de Santana, M. T. Baumgartner, & L. C. Gomes, 2018. Coexistence between native and nonnative species: the invasion process and adjustments in distribution through time for congeneric piranhas in a Neotropical floodplain. *Hydrobiologia* 817: 279–291.
- Rosa, G. R., G. N. Salvador, A. Bialecki, & G. B. Santos, 2018. Spatial and temporal distribution of ichthyoplankton during an unusual period of low flow in a tributary of the São Francisco River, Brazil. *River Research and Applications* 34: 69–82.
- Rosso, J. J., M. González-Castro, S. Bogan, Y. P. Cardoso, E. Mabragaña, M. Delpiani, & J. M. Díaz de Astarloa, 2018. Integrative taxonomy reveals a new species of the *Hoplias malabaricus* species complex (Teleostei: Erythrinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 28: 235–252.
- Rosso, J. J., E. Mabragaña, M. González-Castro, M. S. Delpiani, E. Avigliano, N. Schenone, & J. M. Díaz de Astarloa, 2016. A new species of the *Hoplias malabaricus* species complex (Characiformes: Erythrinidae) from the La Plata River basin. *Cybium* 40:199-208.
- Saitou, N., & M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Santos, N. C. L., E. García-Berthou, J. D. Dias, T. M. Lopes, I. de P. Affonso, W. Severi, L. C. Gomes, & A. A. Agostinho, 2018. Cumulative ecological effects of a Neotropical reservoir cascade across multiple assemblages. *Hydrobiologia* 819: 77–91.
- Santos, N. C. L., H. S. Santana, J. C. G. Ortega, R. M. Dias, L. F. Stegmann, I. M. da S. Araújo, W. Severi, L. M. Bini, L. C. Gomes, & A. A. Agostinho, 2017. Environmental filters predict the trait composition of fish communities in reservoir cascades. *Hydrobiologia* 802: 245–253.
- Shimabukuro-Dias, C. K., G. J. Costa-Silva, F. Y. Ashikaga, F. Foresti, & C. Oliveira, 2017. Molecular identification of the fish fauna from the pantanal flood plain area in Brazil. *Mitochondrial DNA Part A* 28: 588–592.
- Silva, J. C., R. R. Rosa, E. M. Galdioli, C. M. Soares, W. M. Domingues, S. Veríssimo, & A. Bialecki, 2017a. Importance of dam-free stretches for fish reproduction: the last remnant in the Upper Paraná River. *Acta Limnologica Brasiliensia* 29: e106.
- Silva, C. B., J. D. Dias, & A. Bialecki, 2017b. Fish larvae diversity in a conservation area of a neotropical floodplain: influence of temporal and spatial scales. *Hydrobiologia* 787: 141–152.

- Souza-Shibatta, L., L. F. Pezenti, D. G. Ferreira, F. S. Almeida, S. H. Sofia, & O. A. Shibatta, 2013. Cryptic species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Miranda River, Paraguay River basin, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology* 11: 101–109.
- Suzuki, F. M., & P. S. Pompeu, 2016. Influence of abiotic factors on ichthyoplankton occurrence in stretches with and without dams in the upper Grande River basin, south-eastern Brazil. *Fisheries Management and Ecology* 23: 99–108.
- Suzuki, H. I., F. M. Pelicice, E. A. Luiz, J. D. Latini, & A. A. Agostinho, 2004. Reproductive Strategies of the Fish Community of the Upper Paraná River Floodplain In Agostinho, A. A., L. Rodrigues, L. C. Gomes, S. M. Thomaz, & L. E. Miranda (eds), *Structure and functioning of the Paraná River and its floodplain: LTER - Site 6 (PELD - Sítio 6)*. EDUEM, Maringá: 275.
- Timpe, K., & D. Kaplan, 2017. The changing hydrology of a dammed Amazon. *Science Advances* 3: 1–13.
- Tófoli, R. M., R. M. Dias, G. H. Z. Alves, D. J. Hoeninghaus, L. C. Gomes, M. T. Baumgartner, & A. A. Agostinho, 2017. Gold at what cost? Another megaproject threatens biodiversity in the Amazon. *Perspectives in Ecology and Conservation* 15: 129–131.
- Valdez-Moreno, M., L. Vásquez-Yeomans, M. Elías-Gutiérrez, N. V. Ivanova, & P. D. N. Hebert, 2010. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Marine and Freshwater Research* 61: 665–671.
- Vazzoler, A. E. A. de M., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática*. EDUEM, Maringá.
- Vitule, J. R. S., F. Skóra, & V. Abilhoa, 2012. Homogenization of freshwater fish faunas after the elimination of a natural barrier by a dam in Neotropics. *Diversity and Distributions* 18: 111–120.
- Winemiller, K. O., P. B. McIntyre, L. Castello, E. Fluet-Chouinard, T. Giarrizzo, S. Nam, I. G. Baird, W. Darwall, N. K. Lujan, I. Harrison, M. L. J. Stiassny, R. A. M. Silvano, D. B. Fitzgerald, F. M. Pelicice, A. A. Agostinho, L. C. Gomes, J. S. Albert, E. Baran, M. Petrere, C. Zarfl, M. Mulligan, J. P. Sullivan, C. C. Arantes, L. M. Sousa, A. A. Koning, D. J. Hoeninghaus, M. Sabaj, J. G. Lundberg, J. Armbruster, M. L. Thieme, P. Petry, J. Zuanon, G. T. Vilara, J. Snoeks, C. Ou, W. Rainboth, C. S. Pavanelli, A. Akama, A. V. Soesbergen, & L. Saenz, 2016. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. *Science* 351: 128–129.

Capítulo 2 elaborado e formatado conforme as normas da publicação científica *Biological Invasions*. Disponível em: <<https://link.springer.com/journal/10530>>

Capítulo 2: Invasão biológica em uma cascata de reservatórios: o caso de *Leporinus tigrinus* (Characiformes, Anostomidae) na bacia do Alto Rio Paraná

RESUMO

A bacia do Alto Rio Paraná está sujeita ao impacto de diversas atividades antrópicas, entre as quais a introdução de espécies é particularmente expressiva, tornando-a a ecorregião neotropical com o maior número de espécies não-nativas. O objetivo deste trabalho foi investigar a possível invasão biológica de *L. tigrinus* nesta bacia intensamente fragmentada. Para tanto, foi realizado um inventário de sua ocorrência na bacia por meio de consulta a museus, assim como amostragens de juvenis, adultos e ictioplâncton em três tributários do Reservatório de Porto Primavera (rios Aguapeí, Pardo e Verde). Também foram analisados a dieta e aspectos reprodutivos. Foram amostrados 23 espécimes de *L. tigrinus* (10 adultos e 13 juvenis) e 5 ovos (identificados pela técnica de DNA *Barcoding*), evidenciando a ocorrência, a reprodução e o recrutamento da espécie nesta bacia. Os resultados deste estudo suportam que *L. tigrinus* seja uma espécie introduzida na bacia do Alto Rio Paraná, capaz de se dispersar por grandes distâncias ao transpor diversas barragens no sentido montante-jusante, possivelmente via turbinas, vertedouros, eclusas e/ou passagens para peixes. Essas características do processo de invasão diferem dos padrões observados para a maioria das espécies invasoras da bacia e sugerem uma substancial dispersão para jusante de barragens, mesmo quando inexitem passagens para peixes. O sucesso de *L. tigrinus* na invasão da bacia do Alto Rio Paraná pode estar relacionado à utilização de diferentes habitats ao longo do seu ciclo de vida, a sua elevada plasticidade na dieta, bem como a sua distribuição nas áreas mais internas e profundas de reservatórios.

Palavras-chave: Espécie Invasora. Introdução de Espécies. Estabelecimento. Dispersão. Conectividade.

Biological invasion in a reservoir cascade: the case of *Leporinus tigrinus* (Characiformes, Anostomidae) in the Upper Paraná River basin

ABSTRACT

The Upper Paraná River basin is harmed by several human activities among which the introduction of species is particularly expressive, making it the Neotropical ecoregion with the largest number of non-native species. The aim of this study was to investigate the possible biological invasion of *Leporinus tigrinus* in this intensely fragmented basin. For this purpose, an inventory of its occurrence in the basin was carried out through museum consultation, as well as sampling of fish (juveniles and adults) and ichthyoplankton in three tributaries of the Porto Primavera Reservoir (Aguapeí, Pardo and Verde rivers). Diet and reproductive aspects were also analyzed. Twenty-three specimens of *L. tigrinus* (10 adults and 13 juveniles) and five eggs (identified by DNA Barcoding) were sampled, evidencing the occurrence, reproduction and recruitment of this species in the basin. The results of this study support that *L. tigrinus* is a species introduced in the Upper Paraná River basin, capable of dispersing over great distances by transposing several dams (from upstream to downstream), possibly via turbines, spillways, locks and/or fishways. These characteristics of the invasion process differ from the patterns observed for most invasive species in this basin and suggest a substantial downstream dispersion through dams, even when fishways are not present. The success of *L. tigrinus* in the invasion of the Upper Paraná River basin may be related to the use of different habitats throughout its life cycle, its high plasticity in the diet, as well as its distribution in the inner and deep areas of reservoirs.

Keywords: Invasive Species. Species Introduction. Establishment. Dispersal. Connectivity

1 INTRODUÇÃO

Sob a óptica biogeográfica, espécies exóticas são aquelas que ocorrem em locais fora de sua distribuição geográfica original (conhecida ou consensual) e cuja ocorrência na nova área era inviabilizada, no passado, por uma barreira à sua dispersão (Occhipinti-Ambrogi and Galil 2004; Heger et al. 2013). Eventualmente, uma espécie exótica pode se tornar invasora, quando, após constituir populações persistentes e autossustentáveis por meio da reprodução e do recrutamento (estabelecimento), se dispersa pelo novo ambiente, povoando locais distantes da área ocupada pela população fundadora (Vermeij 1996; Richardson et al. 2000; Pyšek et al. 2004; Heger et al. 2013).

Grande parte das invasões biológicas foram mediadas e/ou facilitadas por atividades humanas (comércio, migração, turismo, projetos de infraestrutura etc.) e, desde a chegada dos europeus às Américas no século XV, a taxa de invasões tem aumentado progressivamente, intensificando-se nas últimas décadas devido a globalização (Hulme 2009; Turbelin et al. 2017). Esta tendência é preocupante, uma vez que a introdução de espécies está entre as principais causas de extinções recentes no mundo (Bellard et al. 2016a), levando ao empobrecimento e homogeneização de ecossistemas (Olden et al. 2004; Daga et al. 2014; Toussaint et al. 2016).

A chegada de organismos a novas localidades geralmente é sucedida pelo perecimento de suas populações (Mack et al. 2010). No entanto, características relacionadas ao processo de invasão em si, como alta pressão de propágulo e múltiplos eventos introdutórios (Roman and Darling 2007; Vahsen et al. 2018), atributos do invasor, como plasticidade no uso de recursos, alta fecundidade e grande habilidade dispersora (Agostinho et al. 2014; Liu et al. 2017), e características dos habitats, como adequabilidade climática (Howeth et al. 2016; Bellard et al. 2016b) e existência de corredores de dispersão (Hulme 2009), podem favorecer a persistência, proliferação e dispersão de espécies não-nativas.

Ecossistemas fluviais são particularmente susceptíveis à invasão (Agostinho et al. 2007), por serem interconectados em sua multidimensionalidade (Ward 1989), o que facilitaria a dispersão de invasores. Entretanto, devido ao crescente número de barragens construídas sobretudo para a geração de energia elétrica, poucos são os rios que apresentam um fluxo livre ao longo de todo seu curso (Nilsson et al. 2005; Zarfl et al. 2015; Grill et al. 2019).

Ao mesmo tempo que a construção de barragens pode viabilizar invasões ao causar impactos que favorecem o estabelecimento de espécies não-nativas (Havel et al. 2005), uma bacia fortemente regulada pode dificultar ou mesmo impedir a movimentação e dispersão de peixes (Pelicice et al. 2015; Reis et al. 2016), potencialmente limitando a expansão da área ocupada por espécies introduzidas.

Na América do Sul, a bacia do Alto Rio Paraná é a mais regulada, tendo seu rio principal e maiores tributários convertidos em uma cascata de reservatórios (Agostinho et al. 2008). Originalmente, ela se estendia desde os trechos mais altos da bacia até a barreira natural representada pelo Salto de Sete Quedas, que a separava da bacia do Baixo Rio Paraná, uma província ictiofaunística distinta (Abell et al. 2008). Com a construção da Usina Hidrelétrica (UHE) de Itaipu e a consequente inundação desta barreira em 1982, houve uma massiva invasão da bacia do Alto Rio Paraná por espécies de peixes endêmicas do Baixo Rio Paraná (Júlio Júnior et al. 2009; Vitule et al. 2012) e a barreira à dispersão de espécies se deslocou cerca de 150 km para jusante, passando a ser constituída pela barragem de Itaipu. Com o início da operação de uma passagem para peixes conhecida como “Canal da Piracema” nesta usina, a partir de 2002, espécies provenientes do Baixo Rio Paraná passaram a ter acesso contínuo aos trechos a montante de sua barragem (Makrakis et al. 2007, 2011), o que tem resultado no sucesso de novas invasões biológicas na bacia do Alto Rio Paraná ao longo do tempo (Agostinho et al. 2014; Ota et al. 2018).

Atualmente, a bacia do Alto Rio Paraná é a ecorregião neotropical com o maior número de espécies não-nativas (105 espécies; Gubiani et al. 2018), sendo possível identificar ao menos dois padrões distintos de invasão biológica nesta bacia. O primeiro padrão é o apresentado pela maioria dos invasores (cerca de 60 espécies), que migraram do Baixo Rio Paraná (Gubiani et al. 2018; Ota et al. 2018). Estas espécies têm sua expansão para montante limitada por barramentos e, portanto, apresentam distribuição restrita aos trechos mais baixos da bacia (Júlio Júnior et al. 2009; Casimiro et al. 2017). O outro padrão é o apresentado por espécies de interesse em alguma atividade humana, como as oriundas da piscicultura, da estocagem e do aquarismo, bem como as utilizadas na pesca esportiva e como iscas vivas (Gubiani et al. 2018). Estas espécies tiveram múltiplos eventos e focos de introdução e, por isso, estão mais amplamente difundidas (Daga et al. 2014; Garcia et al. 2018).

Entretanto, um terceiro padrão pode estar ocorrendo na bacia do Alto Rio Paraná, envolvendo a dispersão da espécie invasora rio abaixo, apesar da fragmentação por barragens. Esse fenômeno foi observado para a espécie *Leporinus tigrinus* Borodin, 1929, um anostomídeo de médio porte, coloração amarelada, com bandas escuras sobre a cabeça e o tronco (Santos and Jégu 1989), cuja distribuição geográfica original ainda é controversa. Langeani et al. (2007) consideram a espécie como nativa da bacia do Alto Rio Paraná, enquanto outros trabalhos e inventários de espécies (*checklists*) apresentem-na como nativa da bacia dos Rios Tocantins-Araguaia (Britski and Garavello 2007) e introduzida (Froehlich et al. 2017) ou possivelmente introduzida (Santos et al. 2013; Ota et al. 2018) na bacia do Alto Rio Paraná. Ainda quando

considerada não-nativa, os motivos que teriam levado à introdução desta espécie na bacia permanecem ignorados (Froehlich et al. 2017).

Assim, o objetivo deste estudo foi esclarecer se (1) *L. tigrinus* é uma espécie não-nativa na bacia do Alto Rio Paraná e, em caso de confirmação, se (2) *L. tigrinus* se estabeleceu na bacia, constituindo populações autossustentáveis por meio da reprodução e do recrutamento; se (3) seus traços ecológicos e de história de vida podem estar relacionados com o sucesso da invasão; e se (4) a espécie foi capaz de se dispersar a jusante por longas distâncias em um ambiente intensamente fragmentado, o que representaria um novo modelo de invasão biológica para a bacia.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo

Com uma área de drenagem de aproximadamente 2.966.900 km² e estendendo-se por cinco países (Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai), a bacia do Rio Paraná (também conhecida como bacia do Rio da Prata) é a quinta maior do mundo e a segunda maior da América do Sul (Wolf et al. 1999). Seu trecho superior, denominado bacia do Alto Rio Paraná, se estende atualmente até a barragem de Itaipu (Fig. 1) e é considerado uma ecorregião de elevada diversidade ictiofaunística (Langeani et al. 2007).

Esta bacia drena grandes centros urbanos e importantes áreas agrícolas e industriais do Brasil, estando sujeita a diversos impactos antropogênicos, como o desmatamento, a poluição, a perda de habitats, a construção e operação de usinas hidrelétricas (que atinge todos os seus principais cursos hídricos) e a introdução de espécies exóticas (Agostinho et al. 2008; Pelicice et al. 2017).

As amostragens de peixes e ictioplâncton foram realizadas na área de influência do maior reservatório existente no Rio Paraná, formado pela construção da Usina Hidrelétrica (UHE) Engenheiro Sergio Motta, também conhecida como Porto Primavera. Os trechos amostrados localizam-se em três tributários do reservatório, que preservam características naturais do regime hidrológico: rio Aguapeí (livre de barramentos) e rios Pardo e Verde (levemente regulados em seu trecho superior). Em conjunto com a planície de inundação do Rio Paraná, localizada a jusante da barragem de Porto Primavera, estes tributários são reconhecidos como importantes sítios de reprodução para várias espécies de peixes (Da Silva et al. 2015; 2019), contribuindo para a manutenção da diversidade no Reservatório de Porto Primavera por meio de uma dinâmica fonte-sumidouro (Marques et al. 2018).

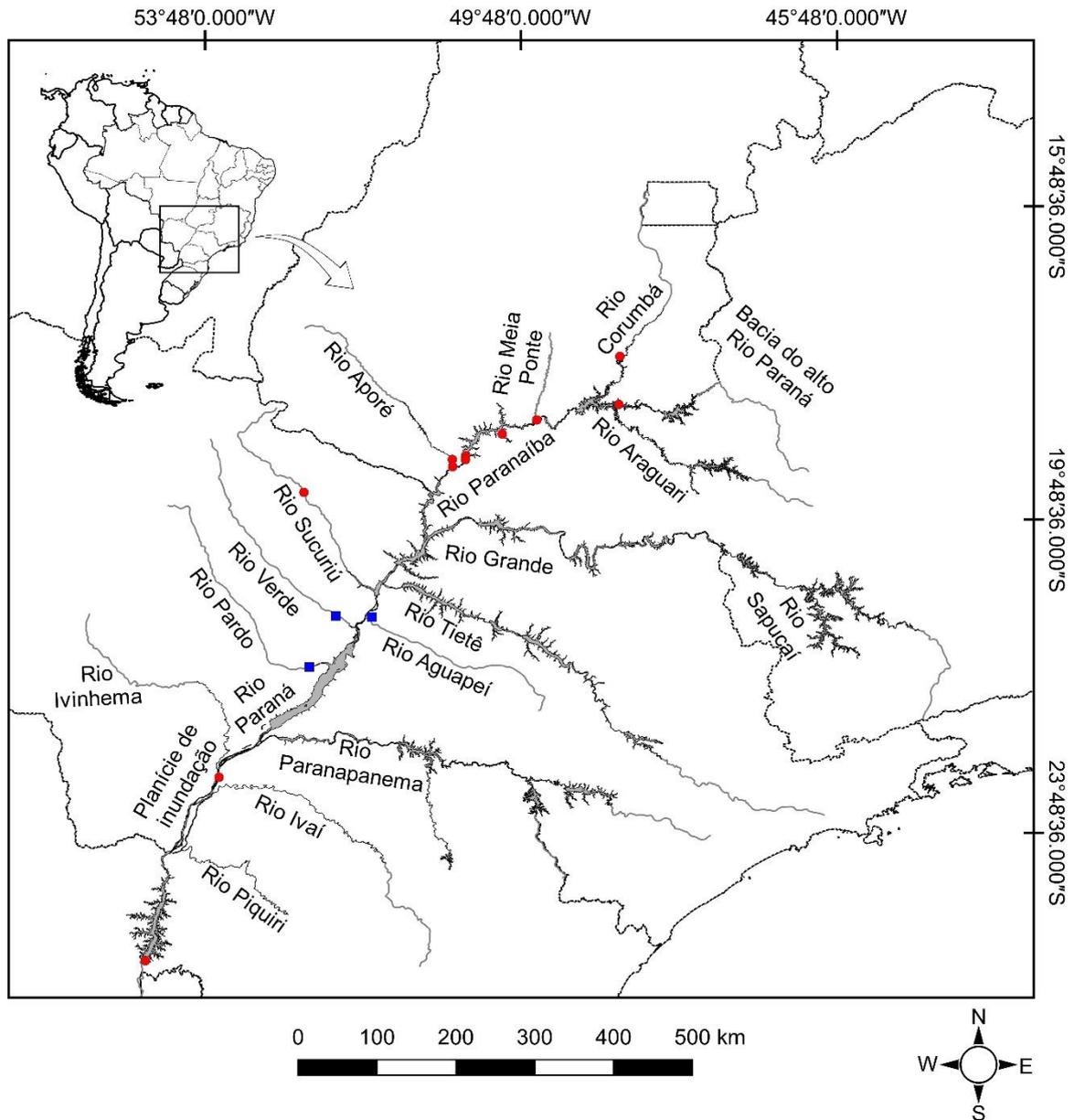


Figura 1. Locais de ocorrência de *Leporinus tigrinus* na bacia do Alto Rio Paraná. Os círculos em vermelho representam os registros depositados em museu e os quadrados azuis, os locais onde a espécie foi registrada no presente estudo: Rio Aguapeí (21,083967°S; 51,712953°O); Rio Pardo (21,689089°S; 52,481667°O); Rio Verde (21,037217°S; 52,146106°O).

2.2 Obtenção de dados de ocorrência, reprodução e recrutamento

Com o intuito de elucidar a origem de *L. tigrinus* na bacia do Alto Rio Paraná (nativa ou não-nativa), foi realizado um inventário dos locais e datas de registro da espécie nesta bacia, associando dois métodos: (i) consulta a coleções científicas por meio da rede *speciesLink* (<http://www.splink.org.br>), que integra dados de diversos museus, e (ii) amostragens de campo.

Além de ampliar o trecho inventariado, as amostragens de campo buscaram constatar eventual atividade reprodutiva e recrutamento de *L. tigrinus* na bacia, de modo a esclarecer se a espécie apresenta populações capazes de se auto sustentarem no ambiente.

Para análise da atividade reprodutiva e recrutamento, foram realizadas amostragens em três tributários do Reservatório de Porto Primavera (rios Aguapeí, Pardo e Verde), entre os anos de 2011 e 2018, em períodos reprodutivos e não-reprodutivos. Ao todo, foram 141 amostragens (47 por tributário), as quais foram realizadas de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Número de protocolo 59/09). As amostragens foram realizadas utilizando-se duas baterias de redes de espera de diferentes malhas (2.5; 3; 4; 5 e 6 cm) com 10 metros de comprimento, instaladas às 17h na calha principal dos tributários e em lagoas marginais. Nas calhas dos rios, as redes foram instaladas próximas às margens, em locais com baixo fluxo de água, enquanto nas lagoas, foram distribuídas nas margens e também na região limnética do corpo hídrico. O tempo de exposição foi de aproximadamente 4 horas.

Os peixes amostrados foram conservados em gelo até chegarem ao laboratório, onde foi realizada a identificação do sexo e estágio de maturação gonadal dos espécimes através da inspeção macroscópica de suas gônadas conforme descrito por Vazzoler (1996).

A detecção de desovas da espécie nos tributários foi realizada por meio de amostragens mensais do ictioplâncton, de novembro de 2017 a abril de 2018, nos mesmos três tributários do Reservatório de Porto Primavera. As coletas foram feitas através de arrastos horizontais durante 10 minutos na subsuperfície da água (20 cm de profundidade), entre 21h e 23h, utilizando-se de rede de plâncton cônico-cilíndrica de 0,5mm de malha. As amostras foram conservadas em etanol 90% e mantidas resfriadas até serem armazenadas em congeladores à temperatura de -20°C.

Em laboratório, ovos e larvas de peixes passaram pelo processo de triagem, com o intuito de separá-los de outros organismos e detritos. Este procedimento foi realizado com o auxílio de microscópio estereoscópico sobre placa de acrílico do tipo Bogorov.

2.3 Identificação molecular do ictioplâncton

Para identificar ovos e larvas de *L. tigrinus* nos tributários do Reservatório de Porto Primavera, estes foram submetidos à extração do DNA com resina *Chelex100* e proteinase K. Na sequência, foi realizada a amplificação do gene *citocromo C oxidase subunidade 1 (COI*, 648 pb), utilizando-se os primers descritos por Ward et al. (2005), e o sequenciamento dos

amplicons em sequenciador automático ABI 3500 XL (*Applied Biosystems*). Os protocolos pormenorizados de extração, amplificação e sequenciamento do gene COI encontram-se descritos em Frantine-Silva et al. (2015).

As sequências foram editadas e alinhadas com o uso do programa Clustal W (Thompson et al. 1994) implementado no programa MEGA7 (Kumar et al. 2016) e comparadas com o banco de dados do GenBank, através do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Apenas as sequências que apresentaram similaridade superior a 98% com a sequência de *L. tigrinus* depositada no banco de dados do GenBank (*voucher* GEPEMA-5514, proveniente de espécime coletado no Rio Araguaia; Ramirez et al. 2016), foram consideradas como pertencentes à espécie em estudo.

2.4 Traços ecológicos - composição da dieta

A dieta da espécie foi analisada a partir de exemplares previamente fixados em formol 10%. Para tanto, foi realizada a remoção dos estômagos através de incisão abdominal e apenas aqueles cheios ou parcialmente cheios foram considerados.

Com auxílio de estereomicroscópio, os conteúdos estomacais foram identificados em categorias abrangentes. Os itens alimentares foram quantificados de acordo com o método volumétrico (Hyslop 1980), estimado pela compressão do material com lâmina de vidro sobre placa milimetrada, até uma altura de 1 mm (Hellawell and Abel 1971).

3 RESULTADOS

3.1 Ocorrência e Dispersão

Conforme os depósitos em museus (Tabela 1), o primeiro registro de *L. tigrinus* na bacia do Alto Rio Paraná ocorreu no Reservatório de Corumbá, estado de Goiás, no ano de 1999, e corresponde à região mais alta da bacia onde a espécie foi registrada. Novos registros foram se sucedendo ao longo do tempo, com expansão da área de distribuição para jusante. Assim, além do Rio Corumbá, *L. tigrinus* foi registrada nos rios Paranaíba e Paraná, bem como em tributários destes grandes rios (Tabela 1; Fig. 1). A área de distribuição da espécie abrange uma cascata de oito reservatórios, formados pelas UHEs de Corumbá, Itumbiara, Cachoeira Dourada, São Simão, Ilha Solteira, Jupia, Porto Primavera e Itaipu, cujas características estão reunidas na Tabela 2. Turbinas, vertedores, eclusas e passagens para peixes (escada para peixes na UHE

Porto Primavera e Canal da Piracema – canal seminatural – na UHE Itaipu) podem ser possíveis vias de conectividade entre os trechos de montante e jusante destas barragens (Tabela 2).

Tabela 1. Registros de ocorrência de *Leporinus tigrinus* na bacia do Alto Rio Paraná, em ordem cronológica crescente. Foram considerados apenas os espécimes depositados em museu e com coordenadas geográficas dos locais de coleta (<http://www.splink.org.br>). (*) primeiro registro na bacia. (**) expansão para jusante na distribuição da espécie. Registros em negrito são aqueles obtidos pelo presente estudo. Nupélia - UEM = Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá. MCT - PUCRS = Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. LIRP – USP = Laboratório de Ictiologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. DZSJRP – UNESP = Departamento de Zoologia de São José do Rio Preto da Universidade Estadual Paulista. MZUEL = Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina.

Data	Rio	Local	Latitude	Longitude	Instituição	Número no Catálogo
09/04/1999*	Corumbá	Caldas Novas/GO	17,726944°S	48,548333°O	Nupélia - UEM	NUP 1093
20/03/2001**	Meia Ponte	Cachoeira Dourada/GO	18,537222°S	49,600833°O	MCT - PUCRS	MCP-Peixes 42747
23/03/2001	Meia Ponte	Cachoeira Dourada/GO	18,537500°S	49,600833°O	MCT - PUCRS	MCP-Peixes 33962
09/10/2008**	Claro	Cacu/GO	19,0425°S	50,669444°O	Nupélia - UEM	NUP 8874
17/02/2009	Claro	Cacu/GO	19,133055°S	50,665555°O	Nupélia - UEM	NUP 8875
26/07/2009	Claro	Cacu/GO	19,133055°S	50,665555°O	Nupélia - UEM	NUP 8876
30/07/2009	Paranaíba	São Simão/GO	19,0425°S	50,503888°O	LIRP - USP	LIRP 7308
01/01/2010	Paranaíba	São Simão/GO	18,994444°S	50,50222°O	LIRP - USP	LIRP 7811
01/01/2010	Paranaíba	São Simão/GO	19,0425°S	50,503888°O	LIRP - USP	LIRP 7829
01/01/2011	Paranaíba	São Simão/GO	19,042580°S	50,50388°O	LIRP - USP	LIRP 8387
01/04/2011	Paranaíba	São Simão/GO	19,0425°S	50,503888°O	LIRP - USP	LIRP 8635
01/11/2011	Paranaíba	São Simão/GO	19,0425°S	50,503888°O	LIRP - USP	LIRP 8578
09/03/2012	Paranaíba	Araguari/MG	18,33833°S	48,56194°O	DZSJRP - UNESP	DZSJRP-Pisces 15775
24/07/2012**	Sucuriú	Cassilândia/MS	19,461666°S	52,548055°O	Nupélia - UEM	NUP 14407
21/01/2013**	Pardo	Bataguassu/MS	21,689089°S	52,481667°O	MZUEL	MZUEL 19912
22/04/2013	Paranaíba	Santa Vitória/MG	18,716388°S	50,038888°O	Nupélia - UEM	NUP 16872
25/04/2013	Pardo	Bataguassu/MS	21,689089°S	52,481667°O	MZUEL	MZUEL 19913
16/01/2014	Pardo	Bataguassu/MS	21,689089°S	52,481667°O	MZUEL	MZUEL 19915
04/04/2015**	Paraná	Querência do Norte/PR	23,097777°S	53,623055°O	Nupélia - UEM	NUP 17488
08/06/2016	Verde	Brasilândia/MS	21,037217°S	52,146106°O	MZUEL	MZUEL 19916
17/01/2017**	Paraná (Canal da Piracema)	Foz do Iguaçu/PR	25,438888°S	54,555833°O	Nupélia - UEM	NUP 19638
11/01/2018	Verde	Brasilândia/MS	21,037217°S	52,146106°O	MZUEL	MZUEL 19890

Tabela 2. Características das usinas hidrelétricas localizadas no trecho de ocorrência de *Leporinus tigrinus* na bacia do Alto Rio Paraná e possíveis vias de conectividade entre montante e jusante da barragem.

UHE	Volume total do reservatório (km ³)	Quantidade e tipo de turbinas	Vias de conectividade
Corumbá	1.5	3 (Francis)	Turbinas e vertedouros
Itumbiara	17	6 (Francis)	Turbinas e vertedouros
Cachoeira Dourada	0.5	7 (Kaplan) e 3 (Francis)	Turbinas e vertedouros
São Simão	12.5	6 (Francis)	Turbinas e vertedouros
Ilha Solteira	15.5	20 (Francis)	Turbinas, vertedouros e eclusa
Jupiá	2.4	14 (Kaplan)	Turbinas, vertedouros e eclusa
Porto Primavera	15.7	14 (Kaplan)	Turbinas, vertedouros, eclusa e escada para peixes
Itaipu	29	20 (Francis)	Turbinas, vertedouros, passagem para peixes

As amostragens de campo realizadas no presente estudo ampliaram a área de ocorrência da espécie ao registrá-la, a partir de 2013, nos três tributários do Reservatório de Porto Primavera inventariados (Fig. 1; Tabela 1). Ao longo do período amostral, foram coletados 23 exemplares de *L. tigrinus*, dos quais 6 foram depositados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL19890, 19912, 19913, 19915, 19916). Desde a primeira captura da espécie até o término das amostragens, *L. tigrinus* correspondeu a 0.27% dos peixes coletados nos tributários.

O limite austral de distribuição da espécie é a tomada de água (inlet) do Canal da Piracema, na barragem de Itaipu, onde *L. tigrinus* foi registrada em janeiro de 2017 (a aproximadamente 1.250 km do local de registro inicial). A expansão para jusante na área de distribuição da espécie encontra-se representada na Figura 2.

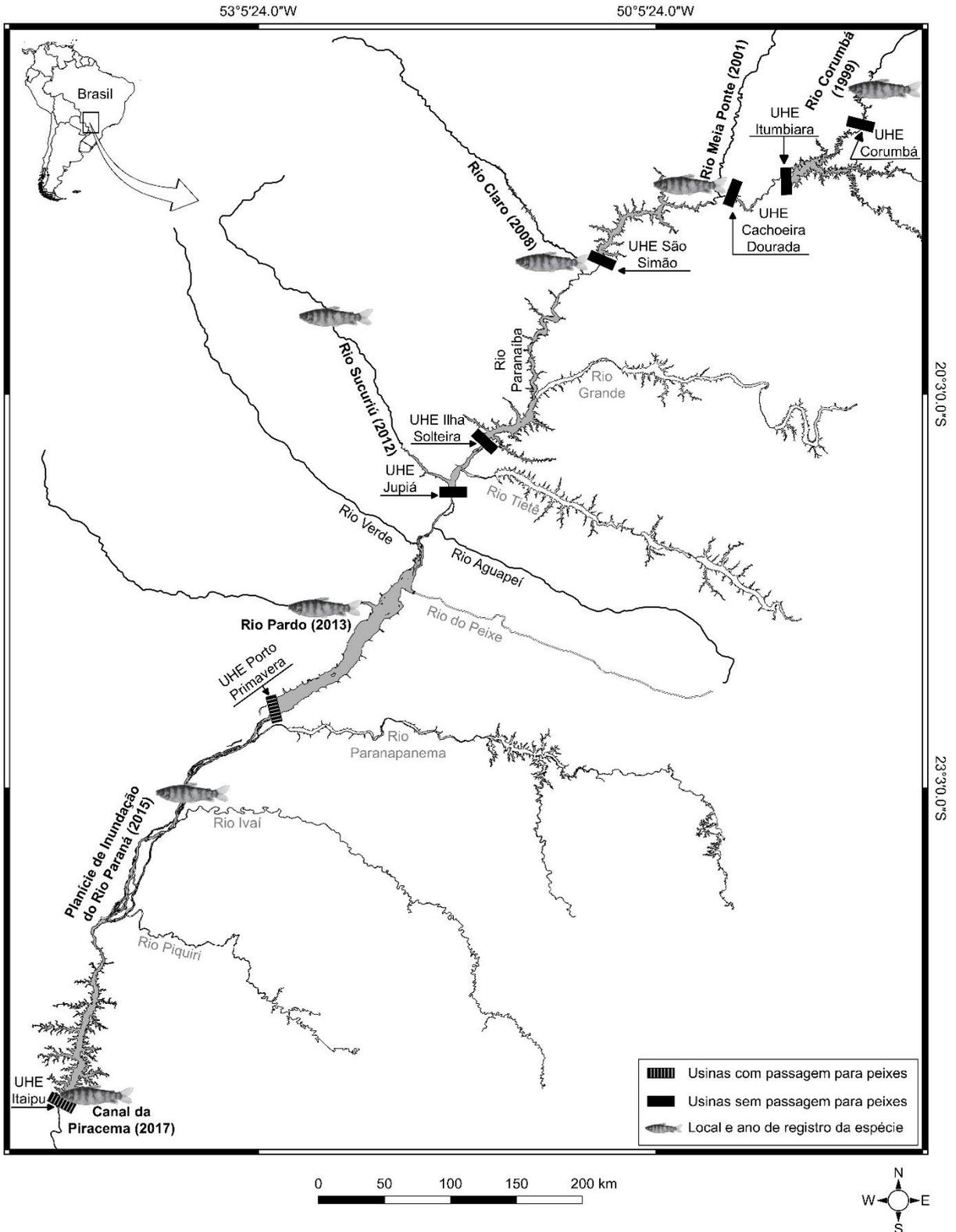


Figura 2. Expansão temporal da área de ocorrência de *Leporinus tigrinus* na bacia do Alto Rio Paraná.

3.2 Reprodução e Recrutamento

Foi detectada atividade reprodutiva de *L. tigrinus* nos três tributários do Reservatório de Porto Primavera estudados. Dos dez adultos capturados (comprimento padrão médio $160,7\text{mm}\pm 23,4$), seis tiveram seu estágio de maturação gonadal avaliado. Dois espécimes do sexo feminino capturados em dezembro de 2013, nos rios Pardo e Aguapeí, estavam em reprodução (ovários maduros). Os outros quatro espécimes foram capturados fora do período reprodutivo (abril e junho) e apresentavam o ovário em repouso.

Entre os 793 ovos e 689 larvas de peixes amostrados na estação reprodutiva de 2017-2018, 132 ovos e 215 larvas foram identificados pela técnica molecular do DNA Barcoding. Cinco ovos coletados no Rio Verde foram identificados como sendo de *L. tigrinus*, por apresentarem similaridade de 100% com a sequência desta espécie depositada no banco de dados do *Genbank*. Os fragmentos de DNA dos ovos analisados apresentaram 561pb.

Os ovos de *L. tigrinus* amostrados são pelágicos não aderentes e esféricos. Um dos ovos coletados, o qual apresentou 2.54mm de diâmetro, espaço perivitelino amplo (0.89mm) e encontrava-se no estágio embrionário de clivagem inicial, foi registrado fotograficamente (Fig. 3A).

O presente estudo também registrou indivíduos jovens, que perfaziam 13 dos 23 espécimes coletados e 7.8% dos imaturos capturados nos tributários desde o primeiro registro da espécie (Fig. 3B). Dois imaturos foram coletados em janeiro de 2013, três em janeiro de 2014, dois em janeiro de 2015 e seis em novembro de 2018.



Figura 3. A. Ovo de *Leporinus tigrinus* em estágio embrionário de clivagem inicial, com 2.54mm de diâmetro, amostrado no Rio Verde em dezembro de 2017. B. *Leporinus tigrinus* jovem (imaturado) coletado em lagoa marginal no Rio Pardo, em 16 de janeiro de 2014 (MZUEL 19915; comprimento padrão: 89mm).

3.3 Composição da Dieta

Dos espécimes de *L. tigrinus* coletados, 11 tiveram o estômago removido para análise, dos quais sete apresentaram conteúdo estomacal. A análise revelou uma dieta predominantemente detritívora e os itens alimentares presentes foram, em ordem de

importância na dieta, detrito orgânico (79.3% do volume), vegetal aquático (10.1%), vegetal terrestre (5.4%), inseto (2.8%), sedimento (1.0%), alga filamentosa (0.9%) e anelídeo (0.4%).

4 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo corroboram a hipótese de que *L. tigrinus* seja uma espécie introduzida na bacia do Alto Rio Paraná, uma vez que, em uma bacia intensamente inventariada (Graça and Pavanelli 2007; Langeani et al. 2007), seria improvável que uma espécie nativa de porte médio e características morfológicas conspícuas (padrão barrado da coloração; Santos and Jégu 1989) fosse registrada apenas em anos recentes (Pavanelli et al. 2007; Santos et al. 2013; Ota et al. 2018). Nos trechos da bacia onde se localizam as usinas hidrelétricas de Ilha Solteira e Jupia, por exemplo, a espécie foi registrada somente a partir de 2008, apesar da realização de inventários da ictiofauna desde a década de 1970, em decorrência dos estudos ambientais exigidos para a construção e operação de tais empreendimentos.

Além disso, se *L. tigrinus* ocorresse originalmente nas bacias do Rio Paraná e dos rios Tocantins-Araguaia, o isolamento geográfico entre suas populações teria culminado em divergências no gene *COI* (Hebert et al. 2003), o que não foi observado no presente estudo (as sequências do gene *COI* dos ovos coletados no Rio Verde e a sequência de referência de *L. tigrinus* proveniente de espécime coletado no Rio Araguaia apresentaram similaridade de 100%). Tais divergências genéticas foram observadas, por exemplo, entre as populações de diferentes bacias hidrográficas da espécie congênica *Leporinus friderici* (Silva-Santos et al. 2018).

Os depósitos em museus revelaram que o primeiro registro de *L. tigrinus* no Reservatório de Corumbá, em 1999, foi sucedido por novos registros em locais a jusante do registro inicial. No trecho amostrado no presente estudo (tributários do Reservatório de Porto Primavera), por exemplo, a espécie passou a ser capturada apenas a partir de 2013, apesar de esforços de coleta intensivos realizados desde 1999 (Marques et al. 2018). A evidente relação da cronologia dos registros com a expansão da área de distribuição da espécie para o sul da bacia (Fig. 2) sugere que populações de *L. tigrinus* foram se dispersando, com o decorrer do tempo, no sentido montante-jusante e colonizando novos trechos, apesar da intensa fragmentação por barragens hidrelétricas

Até o presente, era possível identificar ao menos dois padrões distintos de invasão biológica na bacia do Alto Rio Paraná, envolvendo diferentes vetores e caminhos de introdução. O primeiro deles, descrito por Júlio Júnior et al. (2009), refere-se às espécies que acessaram o

Alto Rio Paraná após a inundação do Salto de Sete Quedas e o funcionamento do sistema de transposição para peixes da UHE Itaipu Binacional (Canal da Piracema), que constitui uma fonte contínua de propágulos (Makrakis et al. 2007; 2011). Essas espécies, provenientes do Baixo Rio Paraná, têm sua dispersão para montante limitada por barragens, embora algumas espécies tenham alcançado trechos mais altos da bacia ao utilizar passagens para peixes e eclusas para navegação (Júlio Júnior et al. 2009; Casimiro et al. 2017). Assim, neste padrão de invasão, trechos não-represados e sem barreiras naturais constituem um caminho livre para dispersão de invasores e as barragens atuam como filtros, que, embora geralmente intransponíveis, possibilitam a passagem de algumas poucas espécies quando existem mecanismos que permitem sua transposição (escadas, eclusas, elevadores).

O outro padrão abarca múltiplos vetores (piscicultura, aquarismo, estocagem, pesca esportiva e utilização de iscas vivas), com vários e dispersos focos de introdução, resultando na ocorrência de invasores em locais disseminados, mas não necessariamente conectados, da bacia (Daga et al. 2014; Garcia et al. 2018; Gubiani et al. 2018). Muitas dessas espécies são sedentárias, generalistas quanto ao uso de recursos, têm tolerância a variações ambientais e podem completar todo seu ciclo de vida em reservatórios, tendendo a permanecer nestes locais, como ciclídeos e pequenos caracídeos (Agostinho et al. 2008). Outras, como alguns migradores provenientes de programas de estocagem (Garcia et al. 2018) ou de escapes de piscicultura (Forneck et al. 2016), apresentam comportamento reofílico e ampla área de vida. Devido ao elevado interesse destas espécies em atividades humanas, é difícil predizer se sua presença em determinado trecho da bacia se deve à existência de um foco local de introdução ou à dispersão de locais onde ela foi previamente introduzida.

O processo de invasão de *L. tigrinus* na bacia do Alto Rio Paraná diferencia-se expressivamente dos padrões descritos anteriormente e o fato desta bacia ser a mais estudada do Brasil (Graça and Pavanelli 2007; Langeani et al. 2007; Marques et al. 2018; Ota et al. 2018) possibilitou a sua detecção, acompanhamento e compreensão. Por não ser uma espécie usualmente utilizada em atividades humanas, um cenário envolvendo múltiplas introduções espacialmente dispersas seria pouco verossímil. Assim, a dinâmica mais plausível do processo de invasão de *L. tigrinus* na bacia do Alto Rio Paraná envolveria a sua introdução em uma região mais alta da bacia (próxima ou no Reservatório da UHE Corumbá), seguida de dispersão longitudinal rio abaixo e também lateral (para tributários). É importante destacar que as bacias do Alto Rio Paraná e dos Rios Tocantins-Araguaia são contíguas, o que facilitaria a transposição de espécies entre elas por seres humanos, ainda que sem o propósito deliberado de realizar a introdução.

Para sustentar esse cenário de aparente contradição envolvendo baixa pressão de propágulo e poucos ou único foco de introdução (espécie sem interesse em atividades antrópicas), mas grande expansão da área de distribuição geográfica, seria necessário que a espécie fosse bem-sucedida na reprodução, no recrutamento e na dispersão pelo novo ambiente. Os dados levantados neste estudo revelam que *L. tigrinus* é capaz de utilizar com sucesso os tributários com trechos lóticos da bacia para se reproduzir e suas áreas inundáveis adjacentes para desenvolvimento e crescimento (berçários).

Quanto à dispersão, a intensa fragmentação da bacia poderia desfavorecê-la, uma vez que barragens e seus reservatórios conceitualmente constituem uma barreira à movimentação de peixes, inclusive no sentido montante-jusante (Pelicice et al. 2015), e manteriam populações aprisionadas dentro dos segmentos entre barragens (Agostinho et al. 2008). Contudo, os resultados deste trabalho contrariam esta ideia, fornecendo evidências de que *L. tigrinus* foi capaz de transpor sete usinas hidrelétricas, possivelmente utilizando turbinas e vertedores, uma vez que, entre as usinas transpostas, apenas Porto Primavera possui passagem para peixes. Estudo recente utilizando PIT-telemetria revelou que indivíduos de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837), espécie de peixe migradora de longas distâncias, conseguem acessar os trechos a jusante da barragem de Porto Primavera utilizando turbinas e/ou vertedores como rotas alternativas à escada para peixes (Celestino et al. 2019). A utilização destas rotas na transposição de hidrelétricas já havia sido sugerida por Makrakis et al. (2012), ao estudar os padrões migratórios de peixes na bacia do Rio Paraná. Na América do Norte, estudos de marcação e recaptura desenvolvidos por Pracheil et al. (2015), no rio Missouri, indicam que turbinas e vertedores podem estabelecer uma substancial conectividade para jusante, mesmo para espécies de grande tamanho corporal, apesar da potencial mortalidade.

O estudo de traços ecológicos e de história de vida fornecem informações importantes para entender o sucesso da invasão de um novo ambiente por uma espécie não-nativa (Agostinho et al. 2014; Liu and Olden 2017). Uma das características que possivelmente favoreceu o estabelecimento e a expansão geográfica de *L. tigrinus* na bacia do Alto Rio Paraná foi a marcante plasticidade alimentar, que demonstra seu oportunismo em aproveitar diferentes recursos disponíveis no ambiente. Monteiro et al. (2008) já haviam observado uma alteração no hábito alimentar desta espécie (de piscívoro para onívoro) após a construção de um represamento no Rio Tocantins e, no presente trabalho, constatou-se um forte predomínio de detritos na dieta. Este recurso alimentar, altamente abundante em ambientes aquáticos, também predomina na dieta da espécie invasora *Hemiodus orthonops* Eigenmann & Kennedy, que

colonizou o Alto Rio Paraná após o início da operação do Canal da Piracema (Agostinho et al. 2014).

Estudos sobre a distribuição espacial da ictiofauna no reservatório da UHE Peixe Angical, instalada no Alto Rio Tocantins, demonstraram que *L. tigrinus* ocupa com sucesso o ambiente litorâneo e, preferencialmente, o ambiente batipelágico (fundo) na zona lacustre do reservatório (Freitas et al. 2008). A forte preferência de *L. tigrinus* pelas regiões mais profundas e internas de reservatórios pode facilitar a entrada de indivíduos desta espécie no tubo de sucção de turbinas e em vertedores, o que fornece um possível indício de como esta espécie conseguiu transpor sete barragens na bacia do Alto Rio Paraná, das quais apenas uma apresentava passagem para peixe.

Embora a espécie ocupe reservatórios com sucesso, o presente estudo demonstrou que *L. tigrinus* depende de ambientes lóticos para sua reprodução, onde seus ovos pelágicos derivam passivamente para jusante até alcançarem ambientes adequados a seu desenvolvimento inicial. Essa necessidade de se deslocar pelo ambiente em busca de biótopos adequados a cada fase do seu ciclo de vida, assim como a habilidade de utilizar passagens para peixes em deslocamentos ascendentes e descendentes (Pereira-Assis et al. 2008; Agostinho et al. 2011), possivelmente explica a grande dispersão da espécie no novo ambiente, ainda que reservatórios e barragens possam limitar a ocupação e a movimentação de outras espécies de peixes (Pelicice et al. 2015).

Ademais, a avaliação da atividade reprodutiva de espécies de peixes antes e após a formação de um reservatório no rio Tocantins revelou que *L. tigrinus* é uma espécie positivamente afetada por represamentos, apresentando considerável aumento no percentual de fêmeas aptas a desovarem (de 30.4 para 83.3%) após a formação do reservatório (Angulo-Valencia et al. 2016). Esta característica pode ter contribuído para o sucesso da espécie na cascata de reservatórios da bacia do Alto Rio Paraná.

Assim, o novo modelo de invasão biológica na bacia do Alto Rio Paraná revelado por este estudo consiste na dispersão de montante para jusante da espécie introduzida, independentemente da existência de barragens, bem como para tributários livres de barramento. A transposição das barragens ocorreria provavelmente por meio de turbinas, vertedores, eclusas e/ou passagens para peixes. Espécies que exploram diferentes habitats ao longo do seu ciclo de vida, com boa capacidade natatória, elevada plasticidade na dieta, capazes de ocuparem reservatórios com sucesso (sobretudo a zona lacustre e ambiente batipelágico) e se beneficiarem das alterações que eles promovem no ambiente seriam mais propensas a apresentarem este tipo de invasão.

O conhecimento deste novo modelo de invasão biológica na bacia do Alto Rio Paraná sugere uma considerável conectividade para jusante em barragens, mesmo na ausência de passagens para peixes, e pode vir a explicar o sucesso de outras espécies invasoras na ocupação de reservatórios em cascata. Além disso, possibilita a predição do estabelecimento e da dispersão de invasores que apresentem traços ecológicos e de história de vida semelhantes, podendo subsidiar medidas para prevenir ou controlar novas invasões e mitigar seus possíveis impactos negativos às comunidades biológicas nativas.

5 REFERÊNCIAS

- Abell R, Thieme ML, Revenga C, et al (2008) Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. *Bioscience* 58:403–414
- Agostinho AA, Pelicice FM, Gomes LC (2008) Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Brazilian J Biol* 68:1119–1132. doi: 10.1590/S1519-69842008000500019
- Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM (2007) *Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil*. Eduem, Maringá
- Agostinho AA, Suzuki HI, Fugi R, et al (2014) Ecological and life history traits of *Hemiodus orthonops* in the invasion process: looking for clues at home. *Hydrobiologia* 746:415–430. doi: 10.1007/s10750-014-2030-2
- Agostinho CS, Pelicice FM, Marques EE, et al (2011) All that goes up must come down? Absence of downstream passage through a fish ladder in a large Amazonian river. *Hydrobiologia* 675:1–12. doi: 10.1007/s10750-011-0787-0
- Angulo-Valencia MA, Agostinho AA, Suzuki HI, et al (2016) Impoundments affect fish reproduction regardless of reproductive strategy. *Lakes Reserv Res Manag* 21:362–374. doi: 10.1111/lre.12151
- Bellard C, Cassey P, Blackburn TM (2016a) Alien species as a driver of recent extinctions. *Biology letters* 12:1-4. doi: 10.1098/rsbl.2015.0623
- Bellard C, Leroy B, Thuiller W, et al (2016b) Major drivers of invasion risks throughout the world. *Ecosphere* 7(3):1–14. doi: e01241. 10.1002/ecs2.1241
- Casimiro ACR, Garcia DAZ, Costa ADA, et al (2017) Impoundments facilitate a biological invasion: Dispersal and establishment of non-native armoured catfish *Loricariichthys platymetopon* (Isbrückler & Nijssen, 1979) in a neotropical river. *Limnologica* 62:34–37
- Celestino LF, Sanz-Ronda FJ, Miranda LE, et al (2019) Bidirectional connectivity via fish ladders in a large Neotropical river. *River Res Appl* 1–11. doi: 10.1002/rra.3404
- Da Silva PS, Makrakis MC, Miranda LE, et al (2015) Importance of reservoir tributaries to spawning of migratory fish in the Upper Paraná river. *River Res Appl* 31:313–322. doi: 10.1002/rra
- Da Silva PS, Miranda LE, Makrakis S, et al (2019) Tributaries as biodiversity preserves: An ichthyoplankton perspective from the severely impounded Upper Paraná River. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 29:258–269. doi: 10.1002/aqc.3037
- Daga VS, Skóra F, Padial AA, et al (2014) Homogenization dynamics of the fish assemblages in Neotropical reservoirs: comparing the roles of introduced species and their vectors. *Hydrobiologia* 746:327–347. doi: 10.1007/s10750-014-2032-0
- Forneck SC, Dutra FM, Zacarkim CE, Cunico AM (2016) Invasion risks by non-native freshwater fishes due to aquaculture activity in a Neotropical stream. *Hydrobiologia* 773:193–205. doi: 10.1007/s10750-016-2699-5

- Frantine-Silva W, Sofia SH, Orsi ML, Almeida FS (2015) DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Mol Ecol Resour* 15:1226–1237. doi: 10.1111/1755-0998.12385
- Freitas IS, Lucinda PHF, Soares AB, Pelicice FM, Akama A (2008) Variações espaciais na estrutura da ictiofauna entre os ambientes do reservatório de Peixe Angical. In: Agostinho CS, Pelicice FM, Marques EE (ed) *Reservatório de Peixe Angical: Bases ecológicas para o manejo da ictiofauna*. UFT, Porto Nacional, pp 39-48
- Froehlich O, Cavallaro M, Sabino J, et al (2017) Checklist da ictiofauna do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Zool* 107:1–14. doi: 10.1590/1678-4766e2017151
- Britski HA, Garavello JC (2007) Família Anostomidae. In: Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (ed) *Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil*. Museu Nacional - UFRJ, Rio de Janeiro, pp 23-27
- Garcia DAZ, Britton JR, Vidotto-Magnoni AP, Orsi ML (2018) Introductions of non-native fishes into a heavily modified river: rates, patterns and management issues in the Paranapanema River (Upper Paraná ecoregion, Brazil). *Biol Invasions* 20:1229–1241. doi: 10.1007/s10530-017-1623-x
- Graça WJ, Pavanelli CS (2007) *Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes*. EDUEM, Maringá
- Grill G, Lehner B, Thieme M, et al (2019) Mapping the world's free-flowing rivers. *Nature* 569:215–221. doi: 10.1038/s41586-019-1111-9
- Gubiani EA, Ruaro R, Ribeiro VR, et al (2018) Non-native fish species in Neotropical freshwaters: how did they arrive, and where did they come from? *Hydrobiologia* 817:57–69. doi: 10.1007/s10750-018-3617-9
- Havel JE, Lee CE, Vander Zanden MJ (2005) Do Reservoirs Facilitate Invasions into Landscapes? *Bioscience* 55:518-525
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 270:313–321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- Heger T, Saul WC, Trepl L (2013) What biological invasions “are” is a matter of perspective. *J Nat Conserv* 21:93–96. doi: 10.1016/j.jnc.2012.11.002
- Hellawell JM, Abel R (1971) A rapid volumetric method for the analysis of the food of fishes. *J Fish Biol* 3:29–37
- Howeth JG, Gantz CA, Angermeier PL, et al (2016) Predicting invasiveness of species in trade - climate match, trophic guild and fecundity influence establishment and impact of non-native freshwater fishes. *Divers Distrib* 22:148–160. doi: 10.1111/ddi.12391
- Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *J Appl Ecol* 46:10–18. doi: 10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x
- Hyslop EJ (1980) Stomach contents analysis - a review of methods and their application. *J Fish Biol* 17:411–429. doi: 10.1111/j.1095-8649.1980.tb02775.x

- Júlio Júnior HF, Tós CD, Agostinho AA, Pavanelli CS (2009) A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. *Neotrop Ichthyol* 7:709–718. doi: 10.1590/S1679-62252009000400021
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Langeani F, Castro RMC, Oyakawa OT, et al (2007) Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotrop* 7:181–197
- Liu C, Comte L, Olden JD (2017) Heads you win, tails you lose: Life-history traits predict invasion and extinction risk of the world’s freshwater fishes. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 27:773–779. doi: 10.1002/aqc.2740
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, et al (2000) Biotic Invasions: Causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecol Appl* 10:689–710
- Makrakis MC, Miranda LE, Makrakis S, et al (2012) Diversity in migratory patterns among Neotropical fishes in a highly regulated river basin. *J Fish Biol* 81:866–881. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03346.x
- Makrakis S, Gomes LC, Makrakis MC, et al (2007) The Canal da Piracema at Itaipu Dam as a fish pass system. *Neotrop Ichthyol* 5:185–195
- Makrakis S, Miranda LE, Gomes LC, et al (2011) Ascent of Neotropical migratory fish in the Itaipu reservoir fish pass. *River Res Appl* 27:511–519. doi: 10.1002/rra.1378
- Marques H, Henrique J, Dias P, et al (2018) Importance of dam-free tributaries for conserving fish biodiversity in Neotropical reservoirs. *Biol Conserv* 224:347–354. doi: S0006320717304597
- Monteiro AS, Oliveira AHM, Pelicice FM, Oliveira RJ (2008) Alterações na disponibilidade de recursos alimentares e na dieta das principais espécies de peixes. In: Agostinho CS, Pelicice FM, Marques EE (ed) *Reservatório de Peixe Angical: Bases ecológicas para o manejo da ictiofauna*. UFT, Porto Nacional, pp 75-84
- Nilsson C, Reidy CA, Dynesius M, Revenga C (2005) Fragmentation and Flow Regulation of the World’s Large River Systems. *Science* 308:405–408. doi: 10.1126/science.1107887
- Occhipinti-Ambrogi A, Galil BS (2004) A uniform terminology on bioinvasions: A chimera or an operative tool? *Mar Pollut Bull* 49:688–694. doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.08.011
- Olden JD, Poff NL, Douglas MR, et al (2004) Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *19:18–24*. doi: 10.1016/j.tree.2003.09.010
- Ota RR, Deprá GC, Graça WJ, Pavanelli CS (2018) Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated. *Neotrop Ichthyol* 16:1–111. doi: 10.1590/1982-0224-20170094
- Pavanelli CS, Graça WJ, Zawadzki CH, et al (2007) Fishes from the Corumbá Reservoir, Paranaíba River drainage, upper Paraná River basin, State of Goiás, Brazil. *Check List* 3:58–64

- Pelicice FM, Azevedo-Santos VM, Vitule JRS, et al (2017) Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. *Fish Fish* 18:1119–1133. doi: 10.1111/faf.12228
- Pelicice FM, Pompeu PS, Agostinho AA (2015) Large reservoirs as ecological barriers to downstream movements of Neotropical migratory fish. *Fish Fish* 16:697–715. doi: 10.1111/faf.12089
- Pereira-Assis CR, Agostinho CS, Marques EE (2008) Padrão temporal e motivação para ascensão da escada da UHE Peixe Angical. In: Agostinho CS, Pelicice FM, Marques EE (ed) Reservatório de Peixe Angical: Bases ecológicas para o manejo da ictiofauna. UFT, Porto Nacional, pp 147-156
- Pracheil BM, Mestl GE, Pegg MA (2015) Movement through dams facilitates population connectivity in a large river. *River Res Appl* 31:517–525. doi: 10.1002/rra
- Pyšek P, Richardson DM, Rejmánek M, et al (2004) Alien plants in checklists and floras: Towards better communication between taxonomists and ecologists. *Taxon* 53:131–143. doi: 10.2307/4135498
- Ramirez JL, Carvalho-Costa LF, Venere PC, et al (2016) Testing monophyly of the freshwater fish *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) through molecular analysis. *J Fish Biol* 88:1204–1214. doi: 10.1111/jfb.12906
- Reis RE, Albert JS, Di Dario F, et al (2016) Fish biodiversity and conservation in South America. *J Fish Biol* 89:12–47. doi: 10.1111/jfb.13016
- Richardson DM, Pysek P, Rejmanek M, et al (2000) Naturalization and Invasion of Alien Plants: Concepts and Definitions. 6:93–107. doi: 10.1046/j.1472-4642.2000.00083.x
- Roman J, Darling JA (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends Ecol Evol* 22:454–464. doi: 10.1016/j.tree.2007.07.002
- Santos CJ, Tencatt LFC, Ota RR, Graça WJ (2013) Second record of *Leporinus tigrinus* Borodin, 1929 (Characiformes: Anostomidae) in the Upper Paraná River basin, Brazil. *Check List* 9:1543–1544
- Santos GM, Jégu M (1989) Inventário Taxonômico e Redescricao das Espécies de Anostomídeos (Characiformes, Anostomidae) do Baixo Rio Tocantins, PA, Brasil. *Acta Amaz* 19:159–213
- Silva-Santos R, Ramirez JL, Galetti Jr PM, Freitas PD (2018) Molecular Evidences of a Hidden Complex Scenario in *Leporinus* cf. *friderici*. *Front Genet* 9:1–9. doi: 10.3389/fgene.2018.00047
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680
- Toussaint A, Beauchard O, Oberdorff T, et al (2016) Worldwide freshwater fish homogenization is driven by a few widespread non-native species. *Biol Invasions* 18:1295–1304. doi: 10.1007/s10530-016-1067-8

Turbelin AJ, Malamud BD, Francis RA (2017) Mapping the global state of invasive alien species: patterns of invasion and policy responses. *Glob Ecol Biogeogr* 26:78–92. doi: 10.1111/geb.12517

Vahsen ML, Shea K, Hovis CL, et al (2018) Prior adaptation, diversity, and introduction frequency mediate the positive relationship between propagule pressure and the initial success of founding populations. *Biol Invasions* 20:2451–2459. doi: 10.1007/s10530-018-1713-4

Vazzoler AEA de M (1996) *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática*. EDUEM, Maringá

Vermeij GJ (1996) An agenda for invasion biology. *Biol Conserv* 96:3–9

Vitule JRS, Skóra F, Abilhoa V (2012) Homogenization of freshwater fish faunas after the elimination of a natural barrier by a dam in Neotropics. *Divers Distrib* 18:111–120. doi: 10.1111/j.1472-4642.2011.00821.x

Ward JV (1989) The Four-dimensional nature of lotic ecosystems. *J North Am Benthol Soc* 8:2–8. doi: 10.2307/1467397

Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, et al (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc B* 360:1847–1857. doi: 10.1098/rstb.2005.1716

Wolf AT, Natharius JA, Danielson JJ, et al (1999) *International River Basins of the World*. *Int J Water Resour Dev* 15:387–427. doi: 10.1080/07900629948682

Zarfl C, Lumsdon AE, Berlekamp J, et al (2015) A global boom in hydropower dam construction. *Aquat Sci* 77:161–170. doi: 10.1007/s00027-014-0377-0