

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**APRIMORAMENTO DO PROTOCOLO DE DNA METABARCODING PARA
APLICAÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO DE ÁREAS PRIORITÁRIAS À
CONSERVAÇÃO DA ICTIOFAUNA DO RIO MOGI-GUAÇU**

GABRIELA OMURA DA COSTA

BOTUCATU - SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**APRIMORAMENTO DO PROTOCOLO DE DNA METABARCODING PARA
APLICAÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO DE ÁREAS PRIORITÁRIAS À CONSERVAÇÃO
DA ICTIOFAUNA DO RIO MOGI-GUAÇU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Aluna: Gabriela Omura da Costa
Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira
Co-Orientador: Dr. André Batista Nobile

BOTUCATU - SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.DIVISÃO
TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Costa, Gabriela Omura da.

Aprimoramento de protocolo de DNA metabarcoding para aplicação
na identificação de áreas prioritárias à conservação da ictiofauna do rio
Mogi-Guaçu / Gabriela Omura da Costa. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Claudio de Oliveira

Coorientador: André Batista Nobile

Capes: 20204000

1. Ictiofauna. 2. Recursos pesqueiros. 3. Conservação da natureza.
4. DNA.

Palavras-chave: Ictioplâncton; Manejo pesqueiro; NGS; Recursos

Sumário

Agradecimentos.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	6
Introdução geral.....	8
<i>Área de estudo</i>	<i>12</i>
Objetivo geral	15
<i>Objetivos específicos - Capítulo 1</i>	<i>15</i>
<i>Objetivos específicos - Capítulo 2</i>	<i>15</i>
Estrutura da tese	16
Capítulo 1 – Aprimoramento de protocolo de DNA metabarcoding aplicado a estudos extensivos de ictioplâncton.....	16
Capítulo 2 – Caracterização da composição espaço-temporal de ovos e larvas de peixes no rio Mogi-Guaçu através de análises moleculares	16
Referências bibliográficas	17
Capítulo 1.....	23
Resumo.....	24
Abstract.....	25
Introdução	26
Material e métodos.....	28
<i>Local de estudo e amostragens</i>	<i>28</i>
<i>Análises moleculares.....</i>	<i>28</i>
<i>Amplificação da região COI</i>	<i>29</i>
<i>Preparo da biblioteca</i>	<i>31</i>
<i>Normalização e sequenciamento das amostras.....</i>	<i>32</i>
<i>Análises bioinformáticas.....</i>	<i>34</i>
Resultados	34
<i>Custos comparativos das abordagens de sequenciamento por Sanger e Illumina Miseq</i>	<i>34</i>
<i>Comparação das métricas esperadas e obtidas</i>	<i>35</i>
<i>Sequenciamento Illumina Miseq e identificação de espécies.....</i>	<i>36</i>
Discussão	40

Conclusão.....	42
Referências bibliográficas	44
Capítulo 2.....	49
Resumo.....	50
Abstract.....	51
Introdução	53
Material e métodos.....	55
<i>Área de estudo</i>	<i>55</i>
<i>Coleta do material biológico</i>	<i>56</i>
<i>Amostragem de ictioplâncton.....</i>	<i>58</i>
<i>Análises moleculares.....</i>	<i>58</i>
DNA <i>barcoding</i>	58
DNA <i>metabarcoding</i>	59
<i>Análises ecológicas.....</i>	<i>60</i>
<i>Análises bioinformáticas.....</i>	<i>62</i>
Resultados	62
<i>DNA <i>barcoding</i> e <i>metabarcoding</i>, caracterização e distribuição do ictioplâncton.....</i>	<i>62</i>
<i>Densidade espaço-temporal, precipitação e vazão</i>	<i>65</i>
Discussão	74
Conclusão.....	77
Referências bibliográficas	80
Material Suplementar.....	87

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof.^o Dr. Cláudio de Oliveira, pela oportunidade oferecida para desenvolver este trabalho.

Ao meu coorientador André Batista Nobile, pelos ensinamentos, oportunidades de participação em eventos científicos, correções e incentivo.

Aos amigos do “Laboratório de Biologia e Genética de Peixes”, por compartilhar momentos incríveis durante essa jornada, além de toda ajuda prestada sempre que necessária.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética, à Seção Técnica de Pós Graduação, ao Departamento de Biologia Estrutural e Funcional e à Biblioteca pela ajuda prestada.

A Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo: 2019/03597-4).

E a todos que direta e indiretamente fizeram parte da realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Resumo

Apesar do Brasil possuir a maior riqueza de peixes do mundo, esta diversidade encontra-se ameaçada por diversos impactos antrópicos, sendo o barramento de rios um dos mais contundentes. Barramentos podem reduzir a diversidade local de peixes por meio de alterações físico-químicas da água, facilitação de introdução e proliferação de espécies não nativas, reestruturação de comunidades, afetando principalmente espécies migradoras de longa distância e favorecendo as sedentárias por consistir numa barreira física, muitas vezes intransponível, prejudicando o recrutamento de novos indivíduos. O conhecimento de períodos reprodutivos, áreas de desova e crescimento são extremamente importantes para a conservação de peixes, visto que tais informações podem subsidiar a delimitação de áreas prioritárias à conservação, auxiliando ações de manejo executadas por entidades federais ou estaduais. Contudo, a taxonomia tradicional apresenta limitações na identificação do ictioplâncton, visto que ovos e larvas apresentam poucos caracteres diagnósticos formados, dependendo do estágio de desenvolvimento. Num primeiro momento, para sanar esse problema, o uso de análises moleculares, baseada no sequenciamento de Sanger, utilizando o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI), se mostrou uma ferramenta altamente resolutive para essa identificação. Entretanto, essa técnica apresenta alto custo e demanda muito tempo de laboratório, quando necessária aplicação em estudos extensivos. Num segundo momento, com o avanço das técnicas de sequenciamento, o sequenciamento de nova geração, utilizando a plataforma Illumina Miseq apresentou potencial para estudos do ictioplâncton, reduzindo tempo e custo, além de aumentar a capacidade a ser analisado e mantendo a resolutive, porém ainda carecendo de aprimoramentos. Os principais objetivos deste estudo foram i) estabelecer um protocolo de DNA metabarcoding aplicado a peixes, efetivo e de baixo custo (capítulo 1); ii) identificação resolutive de todos os indivíduos coletados (capítulo 2); iii) identificar áreas de desova e crescimento de peixes na bacia do rio Mogi-Guaçu, buscando melhor entendimento da dinâmica reprodutiva (capítulo 2). Diante deste cenário, foram conduzidas coletas em seis pontos de um trecho do rio Mogi-Guaçu, em dois ciclos reprodutivos dos anos de 2017 a 2019 (novembro a fevereiro). O material coletado foi submetido a um sequenciamento massivo, utilizando nova metodologia com

dois conjuntos de *primers*, para obtenção do fragmento completo do gene COI (653pb). Com os resultados obtidos pudemos constatar que i) o protocolo aplicado foi capaz de gerar fragmentos com mais de 600 pb que possibilitaram a identificação a nível de espécie, diminuindo expressivamente os custos (capítulo 1); ii) a técnica de DNA *metabarcoding* possibilitou a identificação de 28 táxons a nível de espécie, com grande resolutividade, permitindo a identificação de três espécies que não estavam presentes em estudos de revisão anteriores para a bacia (*Astyanax biotae*, *Pinirampus pirinampu* e *Sorubim lima*) (capítulo 2); iii) há uma distribuição do ictioplâncton condizente com rios neotropicais, com prevalência de ovos nos trechos superiores e larvas nos trechos inferiores, com preferência de espécies de grandes migradores pelo ponto 2 (capítulo 2). Concluimos que os resultados se mostraram promissores na ampliação do conhecimento sobre a ictiofauna em geral, podendo fundamentar ações de manejo mais eficazes para conservação e também para modelo em estudos futuros nessa área de pesquisa.

Palavras-chave: Ictioplâncton, manejo pesqueiro, NGS, recursos pesqueiros.

Abstract

Despite the fact that Brazil has the greatest richness of fish in the world, this diversity is threatened by several anthropic impacts, with damming of rivers one of the most notable. Dams can reduce the diversity of local fish through physical-chemical changes in the water, facilitating the introduction and proliferation of non-native species, restructuring communities, affecting mainly long distances migratory species and favoring sedentary species, consisting of a physical barrier, frequently impassable, hindering the recruitment of new individuals. The knowledge of reproductive periods, spawning and growth areas are extremely important for the conservation of fish, since such information can subsidize the delimitation of priority areas for conservation, assisting management actions carried out by federal or state entities. However, the traditional taxonomy has limitations in the identification of ichthyoplankton, since eggs and larvae have few formed diagnostic characters, depending on the stage of development. At first, to solve this problem, the use of molecular analysis, based on Sanger sequencing, using the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, proved to be a highly resolving tool for this identification. In a second step, with the advancement of sequencing techniques, the new generation sequencing, using the Illumina Miseq platform, presented potential for studies on ichthyoplankton, reducing time and cost, in addition to increasing the capacity to be analyzed and maintaining resolvability, but requiring enhancements. The main objectives of this study were i) to establish an effective and low cost DNA metabarcoding protocol applied to fish (chapter 1); ii) resolute identification of all individuals sampled (chapter 2); iii) identify spawning and fish growth areas in the Mogi-Guaçu River basin, seeking a better understanding of reproductive dynamics (chapter 2).. In view of this scenario, catches were carried out at six points on a stretch of the Mogi-Guaçu River, in two reproductive cycles from 2017 to 2019 (November to February). The collected material was subjected to massive sequencing, using a new methodology with two sets of primers, to obtain the complete fragment of the COI gene (653bp). The results obtained showed that i) the applied protocol was able to generate fragments with more than 600 bp that enabled identification at the species level, significantly reducing costs (chapter 1); ii) the DNA metabarcoding technique enabled the identification of 28 taxa at the species level, with

high resolution, allowing the identification of three species that were not present in previous review studies for the basin (*Astyanax biotae*, *Pirirampus pirinampu* and *Sorubim lima*) (chapter 2); iii) there was a ichthyoplankton distribution consistent with Neotropical rivers, with the prevalence of eggs in the upper stretches and larvae in the lower stretches, with preference for species of great migrators by point 3 (chapter 2). We conclude that the results have shown promise in expanding knowledge about ichthyofauna in general, being able to support more effective management actions for conservation and also for models in future studies in this area of research.

Keywords: Ichthyoplankton, NGS, fishing management, fishing resources.

Introdução geral

Atualmente observamos o crescimento do número de espécies ameaçadas, extintas a nível local e global, situação desencadeada, principalmente, por pressão antrópica em seus ambientes naturais, podendo ser comparada em nível de taxa e magnitude aos eventos de extinção em massa anteriores (BARNOSKY e colab., 2011). Os efeitos dessas ações se estendem por todos os grupos taxonômicos, atingindo até mesmo, aqueles com grande relevância para os humanos, como no caso dos peixes, tendo sua diversidade ameaçada em escala local, regional e global (DUDGEON e colab., 2015; GORDON e colab., 2018; PELICICE e colab., 2017).

Os peixes representam o grupo de vertebrados com maior diversidade do planeta, possuindo mais de 33.900 espécies descritas, dos quais, cerca de 13.000 ocorrem em ambientes de água doce (NELSON, 2016), sendo que, cerca de 5.160, se encontram na região Neotropical (REIS e colab., 2016) e 3.148 em território brasileiro (Livro Vermelho ICMBio). Devido à vasta extensão territorial, o Brasil se destaca neste cenário, possuindo uma grande gama de morfologias e climas diferentes, repercutindo em extensas áreas hidrográficas, resultando na mais rica fauna de peixes do mundo (BUCKUP e colab., 2016; REIS e colab., 2016). Estes organismos exercem importantes funções dentro da organização social humana, servindo como base alimentar e econômica principalmente para comunidades ribeirinhas e costeiras (DUGAN e colab., 2010; HOEINGHAUS e colab., 2009; ISLAM e BERKES, 2016). Além disso, são fundamentais para o ecossistema, auxiliando na regulação, transporte e ciclagem de energia e nutrientes (HELFMAN e COLLETTE, 2009; HOLMLUND e HAMMER, 1999).

No entanto, parte considerável desta diversidade de peixes se encontra sob graus diversos de ameaça, frente à impactos antrópicos, sendo o barramento de rios o que incide mais drasticamente sobre a ictiofauna (AGOSTINHO e colab., 2016; BARLETTA e colab., 2010; CAROLINA e colab., 2016). Barramentos causam drástica alteração ambiental, influenciando negativamente comunidades, interrompendo rotas migratórias, acarretando na diminuição de locais de desova e criadouros naturais (AGOSTINHO e colab., 2007; FRENCH, 1979). Além disso, podem contribuir

com a proliferação de espécies sedentárias e não nativas, resultando em modificações expressivas nos ambientes e comunidades iniciais (AGOSTINHO e colab., 2016; ELETRONORTE, 2007; HOEINGHAUS e colab., 2009; NAM e colab., 2016; SOUZA e colab., 2019).

A depleção de espécies de peixes de grande porte, com rotas migratórias sazonais, é um dos eventos mais comuns em represamentos (AGOSTINHO e colab., 2016). Além de representar um impedimento físico para espécies reofílicas, os barramentos também impossibilitam a deriva larval pela supressão de trechos lóticos, levando ao aumento da mortalidade das larvas (SANTOS e colab., 2008). No rio Grande, cuja bacia possui inúmeros barramentos, as espécies de peixes migradoras tiveram suas populações diminuídas (AGOSTINHO e GOMES, 2006). Neste contexto, afluentes como o rio Mogi-Guaçu apresentam um papel importante na manutenção das espécies, atuando como rotas migratórias alternativas, fornecendo locais adequados para desova, deriva de ovos e larvas e até mesmo berçários para os peixes, como demonstrado por diversos autores (BAUMGARTNER e colab., 2004; BIALETZKI e colab., 2005; CASARIM e colab., 2018; LOPES, 2019; REYNALTE-TATAJE e colab., 2011; SILVA e colab., 2017; VIANNA, 2008).

Desta forma, o ecossistema formado pelo rio Mogi-Guaçu é, indubitavelmente, um dos maiores contribuintes para a manutenção da biodiversidade da Bacia do Alto Paraná (LANGEANI, 2007), onde um inventário feito com um compilado de estudos realizados ao longo do último século, reportou a presença de 150 espécies de peixes (MESCHIATTI e ARCIFA, 2009), e ainda deve ser considerado que no rio Mogi-Guaçu, a região da Cachoeira de Emas constitui uma importante zona de contenção de peixes, onde há uma Pequena Central Hidrelétrica (PCH) (PEIXER e PETRERE JÚNIOR, 2009).

Em consonância com essas informações e visando minimizar os impactos antrópicos, o Instituto Chico Mendes – ICMBio e o Ministério do Meio Ambiente (Portaria nº 316/2009; nº 78/2009) estabeleceram estratégias para elaboração e implementação dos Planos de Ação Nacionais (PAN), dentre os quais figura o PAN Mogi, Pardo e Grande, sob coordenação do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA. Dentre as ações previstas, duas combatem diretamente os efeitos dos barramentos; uma visa mitigar os impactos dos barramentos

sobre espécies de peixes e a segunda tem por objetivo proteger áreas que sejam prioritárias à conservação de espécies de peixes ameaçadas de extinção.

Baseado nesse cenário, destaca-se a importância de estudos relacionados ao ictioplâncton, que agregam dados valiosos para o conhecimento da biologia reprodutiva dos peixes (HEMPEL, 1973), pois podem fornecer o conhecimento de áreas e período reprodutivo preferenciais, possíveis rotas migratórias e sucesso no recrutamento (BAUMGARTNER e colab., 2004; BIALETZKI e colab., 2005; REYNALTE-TATAJE e colab., 2011). Essas informações são extremamente importantes para monitoramento ecológico, análises de impactos ambientais e desenvolvimento de planos de conservação e manejo.

A identificação do ictioplâncton é excepcionalmente complexa, mesmo para taxonomistas experientes, devido ao fato de que os caracteres morfológicos, utilizados como diagnósticos, ainda não estão totalmente formados para serem analisados, principalmente nos ovos (BAUMGARTNER e colab., 2004; REYNALTE-TATAJE e colab., 2012). Assim, os métodos taxonômicos tradicionais têm limitações, dificultando a identificação em nível de espécie, muitas vezes atingindo apenas o nível de ordem (NAKATANI e colab., 2001). Esse limite torna-se um dos mais importantes obstáculos para resolução de questões importantes que poderiam ser esclarecidas com estudos do ictioplâncton (LI e colab., 2006), limitando em muitos casos informações acerca dos processos que influenciam no sucesso das fases iniciais de desenvolvimento de algumas espécies e dificultando propostas de ações de manejo direcionadas.

Diante dessas dificuldades, o uso de ferramentas moleculares como método de identificação resolutivo, tanto para ovos quanto para larvas de peixes, surge como alternativa efetiva para essa problemática. Dentre as técnicas moleculares utilizadas, ressaltam-se as análises bioquímicas, isoenzimas, citogenéticas, dados imunológicos e sequências de DNA (DESSAUER e colab., 1996), que empregam genes ou regiões como marcadores moleculares (HAJIBABAEI e colab., 2007).

Buscando elaborar um sistema unificado de identificação molecular, de forma a padronizar as várias abordagens empregadas para identificar as espécies, HEBERT e colaboradores (2003) criaram um sistema que foi denominado “DNA *barcoding*”. Para alcançar este objetivo, utilizou-se

uma única sequência de 648 pb do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI) para padronização, o qual apresenta um bom sinal filogenético e altas taxas de mutação. Atrelado ao sequenciamento por método enzimático (Sanger), a aplicação do DNA *barcoding* na identificação do ictioplâncton nas bacias hidrográficas brasileiras é recente (ALMEIDA e colab., 2018; CARVARETTO, 2019), embora com grande cobertura, como encontrado em trabalhos realizados nas bacias dos rios Grande e São Francisco (BECKER e colab., 2015) e Paranapanema (FRANTINE-SILVA e colab., 2015), apresentando dados notórios e confirmando a eficácia do uso da técnica, promovendo identificação em nível de espécie, quase total, dos indivíduos analisados.

Entretanto, superado o obstáculo imposto pela identificação tradicional, surge uma nova problemática, o alto custo empregado para as análises, fazendo com que estudos extensivos, com captura de milhares de organismos, sejam impraticáveis utilizando o sequenciamento de Sanger, visto que este seria extremamente caro e requereria alto tempo de laboratório. Deste modo, diversos estudos ecológicos vêm empregando a técnica de DNA *metabarcoding* (DIVOLL e colab., 2018; SASSO e colab., 2017; STOECKLE e colab., 2017), atrelado à plataformas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), baseados em sequenciamento por síntese (SBS) (MCCOMBIE e colab., 2019), a fim de superar essas limitações.

Desta forma, com o surgimento das tecnologias de NGS, tornou-se possível gerar dados com um melhor custo-benefício, em larga escala e em um período de tempo reduzido (GHANBARI e colab., 2015; GUEUNING e colab., 2019; NOBILE e colab., 2019; PORTER e HAJIBABAEI, 2018; TABERLET e COISSAC, 2012). Este método de identificação, envolve a amplificação de *locus* barcode de amostras com diversos organismos pertencentes a espécies diferentes com o posterior sequenciamento utilizando equipamentos de nova geração. Os fragmentos gerados são então montados e alinhados às sequências de bibliotecas de referência barcodes (CURRY e colab., 2018; LINKS e colab., 2013; WEIGAND e colab., 2019). Como resultado, pode-se obter de forma qualitativa e também quantitativa, as espécies encontradas na amostra (PAWLUCZYK e colab., 2015).

Diante destes avanços, se desencadeou uma série de trabalhos utilizando o DNA metabarcoding aplicado à diversos estudos ecológicos e descrição de composição de táxons (BISTA e colab., 2017; EMILSON e colab., 2017; VASSELON e colab., 2017), especialmente em ambientes de água doce (BUSH e colab., 2020; ELBRECHT e colab., 2017), buscando desenvolver abordagens padronizadas que possam auxiliar em estudos de monitoramento ambiental (HERING e colab., 2018; LEESE e colab., 2018; HAJIBABAEI e colab., 2019; PORTER e HAJIBABAEI, 2018). Além disso, a técnica vem sendo empregada, também, em trabalhos nos quais a identificação morfológica apresenta dificuldades, como em conteúdo estomacal (BARBATO e colab., 2019; BERRY e colab., 2017; POMPANON e colab., 2012; SU e colab., 2018), e até mesmo na identificação de ictioplâncton marinho (KIMMERLING e colab., 2018) e na região amazônica (MARIAC e colab., 2018; MAGGIA e colab., 2017).

Trabalhos como o de NOBILE e colaboradores (2019), onde foi empregada a técnica de DNA *metabarcoding* aplicada a estudos do ictioplâncton, resultaram em dados similares aos achados via DNA *barcoding*, se mostrando promissora. Todavia, com o emprego de *primers* já descritos na literatura, foi possível a obtenção de fragmentos contendo no máximo 300 pares de bases. Sendo assim, o presente trabalho tem por intuito, identificar possíveis áreas de reprodução, como locais de desova e crescimento de larvas e juvenis na bacia do rio Mogi-Guaçu, alterando a metodologia de extração e estabelecendo um novo protocolo para identificação molecular, fazendo uso do DNA *metabarcoding* e de tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), possibilitando o uso do fragmento completo do gene COI.

Área de estudo

A bacia hidrográfica do Mogi-Guaçu está localizada na região nordeste do estado de São Paulo e sudoeste do estado de Minas Gerais, tendo sua nascente na cidade de Bom Repouso, MG, situada no Morro do Curvado, possuindo uma altitude média de 1.650 metros (SIGRH, 2020). Compreende a uma área total de drenagem de 17.460 km², sendo que do total, aproximadamente 14.653 km² estão localizados no estado de São Paulo (STORANI e PEREZ FILHO, 2009). O rio

Mogi-Guaçu faz parte da bacia do Alto rio Paraná, e deságua no rio Pardo (SP), sendo estes, afluentes do rio Grande (ESPÍNDOLA e colab., 2003). As precipitações médias variam de 1.400 a 1.600 mm por ano, sendo que a temperatura média da água fica em torno de 25°C, alternando entre 22°C a 28°C (Barbieri, 2000).

Esta bacia se encontra localizada em uma das regiões mais industrializadas, abrangendo 43 municípios, dos quais, 38 possuem sede urbana na área de drenagem, totalizando cerca de 15.000 km². Apresenta grande relevância na área industrial, havendo destaque para agroindústria, possuindo uma população de 1.466.062 habitantes (SEADE, 2011). Possui dois barramentos no leito principal, uma Usina hidrelétrica (UHE Mogi-Guaçu), e uma Pequena Central Hidroelétrica (PCH Emas) que se encontra desativada, a qual não ultrapassa dois metros de altura (MESCHIATTI e ARCIFA, 2009), ambas possuem sistema de transposição de peixes do tipo escada e estão localizadas no segmento superior da bacia.

Foram realizadas amostragens em seis pontos (Ponto 1 a Ponto 6), distribuídos longitudinalmente no eixo do rio Mogi-Guaçu, localizados em corredeiras e áreas de várzea, de forma a permitir comprovar ou não, a existência de áreas de desova e crescimento. Destes pontos, os três primeiros estão situados numa área onde o rio apresenta-se encaixado, sendo um ponto localizado cerca de 20 km a montante do eixo da barragem da PCH de Emas (Ponto 1) e dois pontos a jusante, um localizado imediatamente abaixo da barragem (Ponto 2) e outro cerca de 15 km, numa corredeira presente numa laje de pedra (pedral) (Ponto 3). Os demais pontos estão situados numa área meândrica do rio Mogi-Guaçu, com presença de lagoas marginais (Ponto 4, 5 e 6), localizando-se a aproximadamente 100 km a jusante do Ponto 3, com distância aproximada de 40 km entre o Ponto 4 e o Ponto 6 (Figura 1; Tabela 1). Em termos de extensão, foram avaliados cerca de 175 km de trecho de rio.

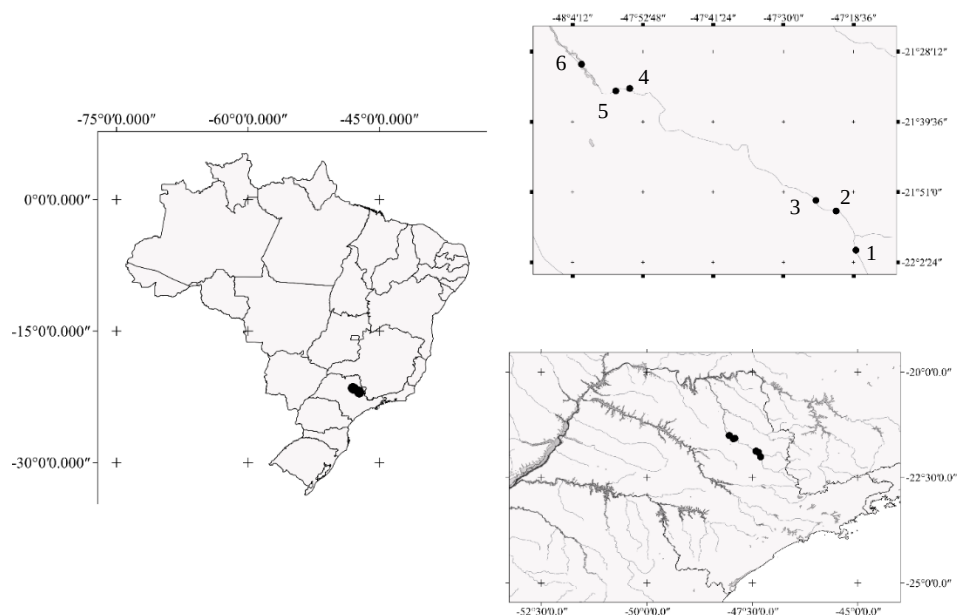


Figura 1. Pontos de amostragem de ictioplâncton localizados no rio Mogi-Guaçu, SP.

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem de ictioplâncton distribuídos no gradiente longitudinal do rio Mogi-Guaçu, SP, Brasil.

Ponto	Ambiente	Latitude	Longitude
1	Montante	21°58'10.70"S 47°	16'8.52"O
2	Jusante	21°55'33.34"S 47°	22'12.53"O
3	Jusante	21°51'13.30"S 47°	26'35.43"O
4	Várzea	21°35'4.95"S 47°	55'23.12"O
5	Várzea	21°35'28.48"S 47°	57'13.71"O
6	Várzea	21°30'12.20"S 48°	2'27.52"O

Objetivo geral

MESCHIATTI e ARCIFA (2009), em sua revisão de literatura, mostraram que, das 150 espécies encontradas na bacia do rio Mogi-Guaçu, 21 são endêmicas de pequenos tributários e as demais 129 espécies ocorrem no próprio rio ou em lagoas marginais. Assim sendo, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar quais dessas espécies se reproduzem no rio Mogi-Guaçu durante o período de chuvas, que inclui o período de defeso (novembro a fevereiro) quando as espécies são protegidas por lei contra a pesca predatória (Lei 10.779 / 2003).

Objetivos específicos - Capítulo 1

Em relevância ao tema que se desenrola no primeiro capítulo, foram estabelecidas as seguintes hipóteses:

- (1) a técnica de DNA *metabarcoding* é eficiente, rápida e de baixo custo na identificação de ovos e larvas de peixes;
- (2) a plataforma Illumina Miseq é capaz de gerar quantidade de dados suficientes em estudos extensivos.

Objetivos específicos - Capítulo 2

Em relevância ao tema que se desenrola no segundo capítulo, foram estabelecidos os seguintes questionamentos:

- (1) das espécies registradas até o momento, quantas estão se reproduzindo na bacia do rio Mogi-Guaçu.
- (2) os peixes de grande porte se reproduzem durante o período de chuvas e assim estão protegidos pela lei do defeso.
- (3) a Pequena Central Hidrelétrica (PCH) de Cachoeira de Emas influencia na reprodução de espécies migradoras de longas distâncias, separando espécies que transpõe e que não transpõe essa barreira.

(4) existem áreas preferenciais de desova e crescimento no gradiente longitudinal do rio Mogi-Guaçu.

Estrutura da tese

A presente Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Genética, do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu - SP, está estruturada em dois capítulos como segue:

Capítulo 1 – Aprimoramento de protocolo de DNA metabarcoding aplicado a estudos extensivos de ictioplâncton

Esse capítulo descreve o protocolo que foi desenvolvido e aplicado em amostras de ictioplâncton coletadas no rio Mogi-Guaçu, demonstrando a eficácia do protocolo e apresentando uma lista da composição taxonômica identificada, assim como, a quantificação dos organismos.

Capítulo 2 – Caracterização da composição espaço-temporal de ovos e larvas de peixes no rio Mogi-Guaçu através de análises moleculares

O presente capítulo caracteriza o padrão de distribuição espaço-temporal do ictioplâncton no rio Mogi-Guaçu ao longo de dois ciclos reprodutivos, realizando a identificação dos ovos e larvas por meio de DNA *barcoding* e *metabarcoding*.

Referências bibliográficas

- AGOSTINHO, A.A. E GOMES, L.C. O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Org.). . Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata. 2ª ed. São Carlos: Rima, 2006. p. 23–56.
- AGOSTINHO, Angelo A. e colab. **Fish assemblages in Neotropical reservoirs: Colonization patterns, impacts and management**. Fisheries Research, v. 173, p. 26–36, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2015.04.006>>.
- AGOSTINHO, Angelo Antonio e GOMES, Luiz C. e PELICICE, Fernando Mayer. **Estocagem**. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil, p. 253–274, 2007.
- BARBATO, Matteo e colab. **Metabarcoding for stomach-content analyses of Pygmy devil ray (*Mobula kuhlii* cf. *eregoodootenkee*): Comparing tissue and ethanol preservative-derived DNA**. Ecology and Evolution, v. 9, n. 5, p. 2678–2687, 2019.
- BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A. **Influência de fatores abióticos na reprodução do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* do rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP)**. Acta Limnologica Brasiliensia, v. 12, n. 2, p. 85-91, 2000.
- BARLETTA, M. e colab. **Fish and aquatic habitat conservation in South America: A continental overview with emphasis on neotropical systems**. Journal of Fish Biology, v. 76, n. 9, p. 2118–2176, 2010.
- BARNOSKY, Anthony D e colab. **Has the Earth ' s sixth mass extinction already arrived ?** Nature, p. 1–7, 2011.
- BAUMGARTNER, Gilmar e colab. **Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River, Brazil**. Environmental Biology of Fishes, v. 71, n. 2, p. 115–125, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10641-004-0098-z>>.
- BECKER, R. A. e colab. **DNA barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the Upper Paraná and São Francisco**. Journal of Fish Biology, v. 87, n. 1, p. 159–168, 2015.
- BERRY, Tina E. e colab. **DNA metabarcoding for diet analysis and biodiversity: A case study using the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*)**. Ecology and Evolution, v. 7, n. 14, p. 5435–5453, 2017.
- BIALETZKI, Andréa e colab. **Larval fish assemblage in the Baía River (Mato Grosso do Sul State, Brazil): Temporal and spatial patterns**. Environmental Biology of Fishes, v. 73, n. 1, p. 37–47, 2005.
- BISTA, Iliana e colab. **Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically**

- relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity.** Nature Communications, v. 8, 2017.
- BUCKUP, Paulo Andreas e SANT, Miriam e GHAZZI, Anna. **Chapter · January 2007.** n. January 2007, 2016.
- BUSH, Alex e colab. **DNA metabarcoding reveals metacommunity dynamics in a threatened boreal wetland wilderness.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 117, n. 15, p. 8539–8545, 2020.
- C. MARIAC, Y. VIGOUROUX, F. DUPONCHELLE, C GARCÍA-DÁVILA, J. NUNEZ, E. DESMARAIS, J.F. Renno. **Metabarcoding by capture using a single COI probe (MCSP) to identify and quantify fish species in ichthyoplankton swarms.** PLoS ONE, v. 13, p. 1–15, 2018.
- CAROLINA, Ana e colab. **The rise and fall of fish diversity in a neotropical river after impoundment.** p. 207–221, 2016.
- CASARIM, Ruanny e colab. **Fish movement patterns in a Neotropical free-flowing tributary located downstream from a large dam.** Marine and Freshwater Research, v. 69, n. 10, p. 1626–1634, 2018.
- CURRY, Colin J. e colab. **Identifying north American freshwater invertebrates using DNA barcodes: Are existing COI sequence libraries fit for purpose?** Freshwater Science, v. 37, n. 1, p. 178–189, 2018.
- DESSAUER, H. C., COLE, C. J. AND HAFNER, M. S. **Molecular Systematics.** Second ed. [S.l.]: Molecular systematics. Sinauer Ass. Inc, 1996.
- DIVOLL, Timothy J. e colab. **Disparities in second-generation DNA metabarcoding results exposed with accessible and repeatable workflows.** Molecular Ecology Resources, v. 18, n. 3, p. 590–601, 2018.
- DUDGEON, David e colab. **Freshwater biodiversity : importance , threats , status and conservation challenges.** n. 2006, p. 163–182, 2015.
- DUGAN, Patrick J e colab. **Fish Migration , Dams , and Loss of Ecosystem Services in the Mekong Basin.** p. 344–348, 2010.
- ELBRECHT, Vasco e colab. **Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring.** Methods in Ecology and Evolution, v. 8, n. 10, p. 1265–1275, 2017.
- ELETRONORTE. **Relatório Socioambiental Centrais Elétricas do Norte do Brasil.** . Brasília: [s.n.], 2007. Disponível em: <<http://www.eln.gov.br/opencms/export/sites/eletronorte/publicacoes/publicacoes/RelatorioSocioAmbiental2007.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2011.
- EMILSON, Caroline E. e colab. **DNA metabarcoding and morphological macroinvertebrate metrics reveal the same changes in boreal watersheds across an environmental gradient.**

- Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13157-x>>.
- ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J. & ELER, M. N. **Avaliação das modificações na qualidade da água do Rio Mogi-Guaçu: uma análise temporal**. São Carlos: [s.n.], 2003.
- FRANTINE-SILVA, W. e colab. **DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring**. Molecular Ecology Resources, v. 15, n. 5, p. 1226–1237, 2015.
- FRENCH, Norman. **Perspectives in Grassland Ecology**. n. 32, p. 5–6, 1979.
- GHANBARI, Mahdi e KNEIFEL, Wolfgang e DOMIG, Konrad J. **A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing**. Aquaculture, v. 448, p. 464–475, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>>.
- GORDON, T A C e colab. **Fishes in a changing world : learning from the past to promote sustainability of fish populations**. p. 804–827, 2018.
- GUEUNING, Morgan e colab. **Evaluating next - generation sequencing (NGS) methods for routine monitoring of wild bees : Metabarcoding , mitogenomics or NGS barcoding**. n. October 2018, p. 847–862, 2019.
- HAJIBABAEI, Mehrdad e colab. **DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics**. Trends in Genetics, v. 23, n. 4, p. 167–172, 2007.
- HEBERT, Paul D N e colab. **Biological identifications through DNA barcodes**. n. September 2002, p. 313–321, 2003.
- HELFMAN, G., B. B. COLLETTE, D. E. Facey & B. W. Bowen. **The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology**. Hoboken: Wiley, 2009.
- HEMPEL, G. **Fish eggs and larval studies (Contributions to a manual)**. FAO - Fish Technical Paper, v. 122, p. 82, 1973.
- HERING, Daniel e colab. **Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive**. v. 138, p. 192–205, 2018.
- HOEINGHAUS, David J e colab. **Effects of River Impoundment on Ecosystem Services of Large Tropical Rivers : Embodied Energy and Market Value of Artisanal Fisheries**. v. 23, n. 5, p. 1222–1231, 2009.
- HOLMLUND, Cecilia M e HAMMER, Monica. **Ecosystem services generated by fish populations**. v. 29, p. 253–268, 1999.
- ISLAM, Durdana e BERKES, Fikret. **Indigenous peoples ’ fisheries and food security : a case from northern Canada**. Food Security, p. 815–826, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12571-016-0594-6>>.
- KIMMERLING, Naama e colab. **Quantitative species-level ecology of reef fish larvae via**

- metabarcoding**. *Nature Ecology and Evolution*, v. 2, n. 2, p. 306–316, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41559-017-0413-2>>.
- LANGEANI, Francisco. **Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná : composição atual e perspectivas futuras**. *Biota Neotropica*, v. 7, n. 3, p. 181–197, 2007. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v7n3/pt/abstract?article+bn03407032007>>.
- LEESE, Florian e colab. **Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries , Disciplines , Cultures and Generations for Aquatic Biomonitoring 2 . 0 : A Perspective Derived From the DNAqua-Net COST Action**. v. 58, p. 63–99, 2018.
- LI, Zhuozhuo e GRAY, Andrew K e LOVE, Milton S. **A key to selected rockfishes (*Sebastes* spp .) based on mitochondrial DNA restriction fragment analysis**. p. 182–196, 2006.
- LINKS, Matthew G. e colab. **MPUMA: A computational approach to microbiota analysis by de novo assembly of operational taxonomic units based on protein-coding barcode sequences**. *Microbiome*, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2013.
- LOPES, Carolina Antonieta. **Mosaic environments shape the distribution of Neotropical freshwater ichthyoplankton**. n. August 2018, p. 544–553, 2019.
- MAGGIA, M E e colab. **DNA Metabarcoding of Amazonian Ichthyoplankton Swarms**. p. 1–14, 2017.
- MCCOMBIE, W. Richard e MCPHERSON, John D. e MARDIS, Elaine R. **Next-generation sequencing technologies**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 9, n. 11, 2019.
- MEHRDAD HAJIBABAEI, TERESITA M. PORTER, CHLOE V. ROBINSON, DONALD J. BAIRD, SHADI SHOKRALLA, Michael T. G. Wright. **Watered-down biodiversity ? A comparison of metabarcoding results from DNA extracted from matched water and bulk tissue biomonitoring samples**. p. 1–16, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0225409>>.
- MESCHIATTI, AJ. AND ARCIFA, MS. **A review on the fishfauna of Mogi-Guaçu River basin : a century of studies**. v. 21, n. 1, p. 135–159, 2009.
- NAKATANI, K., AGOSTINHO, A. A., BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SANCHES, P. V., MAKRAKIS, M. C. & PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: [s.n.], 2001.
- NAM, S e colab. **Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong**. v. 351, n. 6269, p. 128–129, 2016.
- NELSON, J. S., T. C. Grande & M. V. Wilson. **Fishes of the World**. [S.l: s.n.], 2016.
- NOBILE, A. B. e colab. **DNA metabarcoding of Neotropical ichthyoplankton: Enabling high accuracy with lower cost**. *Metabarcoding and Metagenomics*, v. 3, Set 2019.
- NOBILE, André B e colab. **DNA metabarcoding of Neotropical ichthyoplankton : Enabling high accuracy with lower cost**. p. 69–76, 2019.

- PAWLUCZYK, Marta e colab. **Quantitative evaluation of bias in PCR amplification and next-generation sequencing derived from metabarcoding samples.** v. 40, p. 1841–1848, 2015.
- PEIXER, J. & PETRERE JÚNIOR, M. **Socio-economic characteristics of the Cachoeira de Emas small-scale fishery in Mogi-Guaçu River , State of São Paulo , Brazil.** 2009.
- PELICICE, Fernando M. e colab. **Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies.** Fish and Fisheries, v. 18, n. 6, p. 1119–1133, 2017.
- POMPANON, Francois e colab. **Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing.** Molecular Ecology, v. 21, n. 8, p. 1931–1950, 2012.
- PORTER, Teresita M e HAJIBABAEI, Mehrdad. **Automated high throughput animal CO1 metabarcode classification.** Scientific Reports, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22505-4>>.
- REIS, R. E. e colab. **Fish biodiversity and conservation in South America.** p. 12–47, 2016.
- REYNALTE-TATAJE, David Augusto e colab. **Spatial and temporal variation of the ichthyoplankton in a subtropical river in Brazil.** p. 403–419, 2012.
- REYNALTE-TATAJE, David Augusto e colab. **Temporal distribution of ichthyoplankton in the Ivinhema River (Mato Grosso do Sul State / Brazil): Influence of environmental variables.** v. 9, n. 2, p. 427–436, 2011.
- SANTOS, HA.; POMPEU, PS.; VICENTINI, GS.; MARTINEZ, CB. **Swimming performance of the freshwater neotropical fish : Pimelodus maculatus Lacepède , 1803.** p. 433–439, 2008.
- SASSO, Thais e colab. **Environmental DNA characterization of amphibian communities in the Brazilian Atlantic forest : Potential application for conservation of a rich and threatened fauna.** Biological Conservation, v. 215, n. 321, p. 225–232, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2017.09.015>>.
- SIGRH. **SISTEMA DE INFORMAÇÕES PARA O GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO.** Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br/cbhmogi/apresentacao>>. Acesso em: 4 jun 2020.
- SILVA, Jislaine Cristina e colab. **Importance of dam-free stretches for fish reproduction : the last remnant in the Upper Paraná River o último remanescente do alto rio Paraná.** v. 29, 2017.
- SOUZA, Carla Albuquerque De e colab. **Damming interacts with the flood pulse to alter zooplankton communities in an Amazonian river.** n. August 2018, p. 1–14, 2019.
- SPAROVEK, Gerd e colab. **Short Communication Computer assisted Koeppen climate classification : a case study for Brazil Abstract :** v. 266, n. October 2006, p. 257–266, 2007.
- STOECKLE, Mark Y e SOBOLEVA, Lyubov e CHARLOP-POWERS, Zachary. **Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary.** p. 1–15, 2017.

- STORANI, D. L.; PEREZ FILHO, A. Unidades geosistêmicas na Bacia Hidrográfica do rio Mogi Guaçu/SP. 2009, Viçosa: [s.n.], 2009.
- SU, Maoliang e colab. **Dietary Analysis of Marine Fish Species : Enhancing the Detection of Prey-Specific DNA Sequences via High-Throughput Sequencing Using Blocking Primers.** p. 560–571, 2018.
- TABERLET, Pierre e COISSAC, Eric. **Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding.** v. 33, p. 2045–2050, 2012.
- VASSELON, Valentin e colab. **Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding : Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island , France).** Ecological Indicators, v. 82, n. June, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.024>>.
- VIANNA, N. C. & M. G. NOGUEIRA. **Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin , Brazil.** v. 20, n. 2, p. 139–151, 2008.
- WEIGAND, Hannah e colab. **Science of the Total Environment DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe : Gap-analysis and recommendations for future work.** v. 678, p. 499–524, 2019.
- ZAMBALDI, Ludimilla. **Evaluation of River Fragmentation and Implications for the Conservation of Migratory Fish in Southeastern Brazil.** Environmental Management, p. 702–709, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00267-020-01266-9>>.

Capítulo 1

Aprimoramento de protocolo de DNA *metabarcoding* aplicado a estudos extensivos de ictioplâncton

Resumo

Atualmente, com o aumento de espécies ameaçadas, principalmente por consequência de pressões antrópicas, podemos observar a necessidade, cada vez maior de se realizar estudos extensivos focados em conservação. No caso de peixes, estudos relacionados ao ictioplâncton, vêm agregando dados valiosos para o monitoramento ecológico, análises de impactos ambientais e desenvolvimento de planos de conservação e manejo. Entretanto, ferramentas moleculares bem estabelecidas na literatura, como o DNA barcode, que utilizam o gene mitocondrial COI, despendem muito tempo e possuem alto custo por amostra, tornando-se inviável a aplicação nesse tipo de estudo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo, propor a técnica de DNA *metabarcoding* (sequenciamento massivo de *pool* de organismos) e sequenciamento de nova geração, como alternativa ao DNA barcode e sequenciamento de Sanger, mantendo o gene COI como alvo, visando estabelecer um protocolo eficiente e com melhor custo-benefício. Para isso, foram utilizados *primers* estabelecidos na literatura, em conjunto com *primers* desenvolvidos especificamente para este protocolo. Essa nova metodologia foi aplicada em 4.297 organismos ictioplanctônicos, coletados ao longo de um trecho no rio Mogi-Guaçu, durante dois ciclos reprodutivos. Como resultado, foram identificados 29 táxons, um em nível de gênero e 28 em nível de espécie, por um custo equivalente a 2% do que seria utilizado na aplicação do sequenciamento de Sanger. Dessa forma, a metodologia aplicada neste estudo se mostra promissora na obtenção de grande quantidade de dados, a baixo custo, apresentando grande acurácia na identificação de peixes da ictiofauna Neotropical, podendo ser empregada, em estudos de conservação e manejo.

Palavras-chave: Conservação de peixes, NGS, recurso pesqueiro.

Abstract

Because of the increasing number of threatened species, mainly as a result of anthropogenic pressures, we have been able to observe the need to carry out extensive studies focused on conservation. In the case of fish, studies related to ichthyoplankton have been adding valuable data for ecological monitoring, analysis of environmental impacts and development of conservation and management plans. However, molecular tools well established in the literature, such as DNA barcode, which use the mitochondrial gene COI, spend a lot of time and high cost per sample, making it difficult to apply this type of study. Thus, this work aimed to propose the DNA metabarcoding technique (massive sequencing of organism pools) and new generation sequencing, as an alternative to DNA barcode and Sanger sequencing, keeping the COI gene as a target, aiming to establish a protocol efficient and cost-effective. For that, primers established in the literature were used, together with primers developed specifically for this protocol. This new methodology was applied to 4,297 ichthyoplankton organisms, collected along a stretch in the Mogi-Guaçu River, during two reproductive cycles. As a result, 29 taxa were identified, one at the genus level and 28 at the species level, at a cost equivalent to 2% of what would be used in the application of Sanger sequencing. Thus, the methodology applied in this study is promising in obtaining a large amount of data, at low cost, presenting great accuracy in the identification of Neotropical ichthyofauna fish, which can be used in conservation and management studies.

Keywords: Fish conservation, NGS, fishing resource.

Introdução

Nos últimos anos, pudemos observar o decréscimo de populações de inúmeras espécies de animais e plantas, assim como, a extinção destas, podendo muitas vezes, serem relacionadas às altas taxas de crescimento populacional humano, que se estima atingir nove bilhões de indivíduos até 2050 (OECD, 2012). Este crescimento acelerado, mesmo que de forma indireta, ocasiona diversas alterações ambientais, como a fragmentação de habitats, variação climática, entre outros fatores (HADDAD e colab., 2015; PÉREZ-IGLESIAS e colab., 2016; VALLADARES e colab., 2006). Diversas medidas para interromper o desaparecimento de espécies foram adotadas, como por exemplo, a criação de leis visando preservar espécies e habitats ameaçados (NOVACEK e CLELAND, 2001), realocação de indivíduos (CORLETT, 2016; WEEKS e colab., 2011) e manejo *ex situ* (CANESSA e colab., 2015).

Em consequência da escassez de recursos financeiros, os órgãos ou agências incumbidas da conservação de espécies ameaçadas, devem optar por métodos que tenham maior eficácia, buscando diminuir custos e investir em espécies com maior viabilidade de restauração (MARTIN, Tara G e colab., 2018). Deste modo, primeiramente é necessário identificar corretamente as espécies que habitam um determinado ambiente, etapa imprescindível na conservação da biodiversidade, a fim de gerar dados que possibilitem avaliar a riqueza e abundância. Atualmente, a identificação morfológica tradicional foi complementada com métodos moleculares, os quais permitiram superar limites como no caso de homoplasias (PEDERSEN e colab., 2020), plasticidade fenotípica (FERNÁNDEZ-OSUNA e SCARABOTTI, 2016) e identificação de fases iniciais de desenvolvimento (CHU e colab., 2019), que muitas vezes não são abrangidas por chaves morfológicas.

Sendo assim, técnicas como a de DNA *barcoding* proposta por HEBERT e colaboradores (2003), vêm sendo empregadas atualmente, em diversos âmbitos, como estudos taxonômicos, genética de populações e conservação de espécies (HEBERT e colab., 2003; PINTO e colab., 2015), se mostrando eficientes, até mesmo frente a ictiofauna Neotropical, que apresenta grande variedade taxonômica, filogenética e funcional (DE CARVALHO e colab., 2011; PEREIRA, 2011;

SERRANO e colab., 2019). Entretanto, o avanço dos estudos e a necessidade de se gerar dados em grande escala, e em curto tempo, têm evidenciado uma das limitações da técnica de DNA *barcoding*, a inviabilidade em se analisar produtos mistos, constituídos por diversas espécies, prolongando análises de estudos extensivos (PORTER e HAJIBABAEI, 2018). Desta forma, apenas haverá eficácia se acompanhado de um sistema de análise com várias sequências barcodes sendo sequenciadas em paralelo, possibilitada por tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) (SHOKRALLA e colab., 2012).

Sendo assim, a utilização da técnica de DNA *metabarcoding*, que associa o método de DNA *barcoding* com NGS, permite uma identificação efetiva e de alto rendimento, tendo como base amostras com DNA de um complexo de espécies (TABERLET e COISSAC, 2012). Este método vem se mostrando eficaz na identificação de espécies ameaçadas comercializadas ilegalmente, como no caso de chás da medicina tradicional (ARULANDHU e colab., 2017; CHENG e colab., 2014), como também aplicada em amostras de água marinha (SOGIN e colab., 2006), fezes (JI e colab., 2013), solo (NIELSEN e WALL, 2013), artrópodes (GIBSON e colab., 2014) e ictioplâncton marinho (KIMMERLING e colab., 2018) e de água doce (MARIAC e colab., 2018; MAGGIA e colab., 2017; NOBILE e colab., 2019).

Deste modo, a principal vantagem proporcionada pelo método é a possibilidade de identificação de vários indivíduos, de diferentes espécies, concomitantemente, gerando uma quantidade extensa de informações taxonômicas, com menor consumo de tempo e melhor custo-benefício (GHANBARI e colab., 2015; NOVÁK e colab., 2010; TABERLET e COISSAC, 2012; WICKER e colab., 2007). Neste contexto, pesquisas associadas ao estudo de peixes, principalmente estudos envolvendo o ictioplâncton, são beneficiados por permitir a identificação quase total das amostras coletadas (NOBILE e colab., 2019), podendo auxiliar no conhecimento da biologia geral e sistemática de peixes (HEMPEL, 1973), assim como, identificação de áreas e períodos de desovas (BURROWS e colab., 2019; DE LIMA e colab., 2020). Todavia, as técnicas para alcançar tais resultados ainda não se encontram bem estabelecidas na literatura, visto que existem dificuldades, como a implementação de *primers* adequados, que acabam comprometendo a criação de bibliotecas

mais complexas (no caso de tecnologias NGS), levando a utilização de abordagens de sequenciamento mais simples como *single-end* e a obtenção de fragmentos reduzidos do gene COI, como usados no trabalho de Nobile e colab. (2019).

Diante deste cenário, o presente trabalho apresentou uma metodologia adaptada para aplicação de DNA *metabarcoding*, direcionada para peixes. O protocolo em questão, visou a amplificação total do gene COI, por meio da sobreposição de *reads* geradas por conjuntos de *primers*, de forma a superar um dos grandes impasses, relacionado ao banco de dados.

Material e métodos

Local de estudo e amostragens

As amostragens do ictioplâncton foram realizadas, mensalmente, ao longo de dois ciclos reprodutivos (2017/2018 e 2018/2019), sendo que o primeiro, englobou os meses de dezembro a fevereiro, e o segundo, de novembro a fevereiro. As coletas foram conduzidas ao longo de seis pontos localizados em corredeiras e áreas de várzea do rio Mogi-Guaçu, pertencente à bacia do Alto rio Paraná, totalizando 42 amostragens. As amostras foram imediatamente imersas em solução de eugenol, e posteriormente, fixadas em etanol a 96%. Em laboratório, com auxílio de um estereomicroscópio, os ovos e as larvas foram separados de outros materiais presentes nas amostras, como folhas, sedimentos e gravetos, e mantidos em álcool a 96% até o procedimento molecular.

Análises moleculares

Das 42 amostragens, apenas 35 continham ovos/larvas, e dentro de cada amostra, foi realizada uma separação entre esses dois estágios de desenvolvimento. Duas amostras continham mais de 300 larvas, sendo que estas foram subdivididas em amostras menores, e após a divisão, foram formados 37 *pools* (25 *pools* de ovos; 12 *pools* de larvas), os quais variaram de 11 a 703 organismos no caso de ovos, e de 11 a 255 organismos no caso de larvas. O DNA total genômico

dos *pools* de ovos ou larvas, pertencentes à diferentes espécies, separados por meses e pontos de amostragem foi obtido utilizando o protocolo adaptado descrito por GREEN e SAMBROOK (2012), usando proteinase K e fenol:clorofórmio, seguindo os seguintes passos: secagem dos organismos fixados em etanol em ThermoBlock (Applied biosystems) à 50°C por 3 minutos, transferência para tubos tipo *ependorfs* de 1,5 mL com 500µL de tampão de lise e 50µL de Proteinase K (20 mg/ml), incubados por três horas. Após, isolamento do DNA adicionando-se volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25: 24: 1). Inversão dos tubos por 10 minutos, centrifugação a 10.000 RPM por 10 minutos. Fase aquosa transferida para um novo tubo e DNA precipitado em 0.2 volumes de acetato de amônia 10M e 2 volumes de etanol 100%. Recuperação do DNA por centrifugação a 10.000 RPM por 10 minutos. Lavagem do pellet de DNA em etanol 70%, e finalmente, DNA ressuspenso em volume apropriado de *Elution Buffer* pré-aquecido à 56°C.

Amplificação da região COI

Após a extração de DNA de cada pool, os materiais foram visualizados em gel de agarose e submetidos à amplificação da região COI utilizando conjuntos de *primers* diferentes em duas etapas de PCR, sendo alguns *primers* descritos na literatura (WARD e colab., 2005) e outros elaborados neste estudo contendo adaptadores para as regiões P5 e P7 para uso em tecnologia Illumina de sequenciamento de nova geração (Tabela 2; Figura 2). Os primers foram desenhados tendo como base, sequências do gene COI de em torno de 2.000 espécies de peixes, pertencentes a ambientes de água doce e salgada, sendo que a presença de bases degeneradas nos primers internos, foi utilizada para aumentar o alcance na identificação do maior número possível de espécies. Estas duas etapas de PCR referem-se à amplificação do gene COI em fragmentos diferentes de aproximadamente 450 pb visando a otimização do sequenciamento em cartuchos 2 x 250pb ou 2 x 300 pb (Illumina Miseq) de modo a garantir sobreposição de fragmentos com ao menos 30 pb entre os pares de reads e leitura completa dos fragmentos. Em nosso modelo, utilizamos *primers* descritos na literatura com flaqueadores externos a sequência COI e *primers* internos para a produção de dois fragmentos que

foram indexados e sequenciados juntos de modo a formar a sequência completa em torno de 650pb do gene analisado. Deste modo, o uso em conjunto de *primers* descritos na literatura com *primers* internos desenhados neste estudo, aumentam a probabilidade de amplificação do gene em diversos grupos de peixes, sejam marinhos ou água doce. Esta estratégia de uso de coquetel de amplificação já é utilizada com sucesso em diversas famílias (IVANOVA e colab., 2007).

Tabela 2. Sequências de nucleotídeos dos *primers* externos (FishF1, FishF2, FishF6, FishR1, FishR2 e FishR7) e internos (219F, 217F, 214F, 433R, 432R e 434R), para o gene Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI), utilizados neste estudo.

Nome	Sequência 5' - 3'	Referência
FishF1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	Ward et al., 2005
FishF2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	Ward et al., 2005
FishF6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACYAAYCACAAAGAYATTGGCA	Jennings et al., 2019
219F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCCGACATRGCAATCCCYC	Não descrito
217F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCCCGACATRGCMTTCCC	Não descrito
214F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGDCGCCCGACATAGCATTY	Não descrito
FishR1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	Ward et al., 2005
FishR2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	Ward et al., 2005
FishR7	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTARACTTCTGGRTGDCCRAAGAAYCA	Jennings et al., 2019
433R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCCGACATAGYATTCCCHC	Não descrito
432R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG CCCCTAGAATTGAGRAAACHCC	Não descrito
434R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG AGCCCCTAGAATTGAGGARACHC	Não descrito

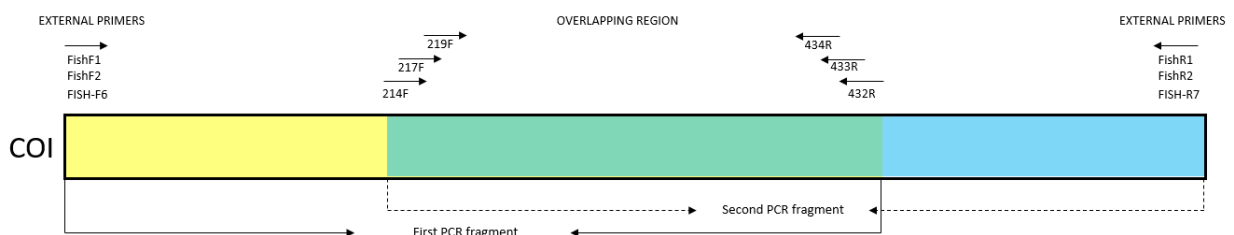


Figura 2. Conjunto de *primers* para amplificação do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) na plataforma Miseq Illumina.

A amplificação dos fragmentos foi realizada em duas etapas, as quais na primeira PCR cada reação continha 0,2 µL de DNA, 12,5 µL de Master Mix (Promega), 10 µL do primeiro conjunto de *primers* (FishF1+FishF2+FishF6+433R+432+434R), o qual foi formado por 50 µL de cada primer a 10mM e 2,3 µL de água em um volume final de 25 µL. As condições da PCR foram 95 °C por 3

min; 5 ciclos de 95 °C por 30 s, 50 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 54 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e extensão final à 72°C por 20 min.

Para a etapa seguinte, cada reação continha 0,2 µL de DNA, 12,5 µL de Master Mix, 10 µL do segundo conjunto de *primers* (FishR1+FishR2+FishR7+219F+217F+214F), o qual foi formado por 50 µL de cada primer a 10mM e 2,3 µL de água em um volume final de 25 µL. As condições da PCR foram 95 °C por 3 min; 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; e extensão final à 72°C por 20 min. Após finalizado, a integridade e o tamanho do DNA foram visualizados em gel de agarose à 2%, com ladder 1kb *plus* (de 100bp em 100 bp), à 100V por 40 min, utilizando 2 µL do produto de cada PCR. Para o preparo dos géis foram adicionados 1 g de Agarose e 50 mL de TAE 1X (20mL de TBE 10X; 980mL de água). Para a corrida eletroforética se utilizou tampão TAE 1X em presença do corante fluorescente GelRed™. Após a eletroforese o gel foi submetido à luz UV em transiluminador para visualização da região gênica amplificada (Figura 3).

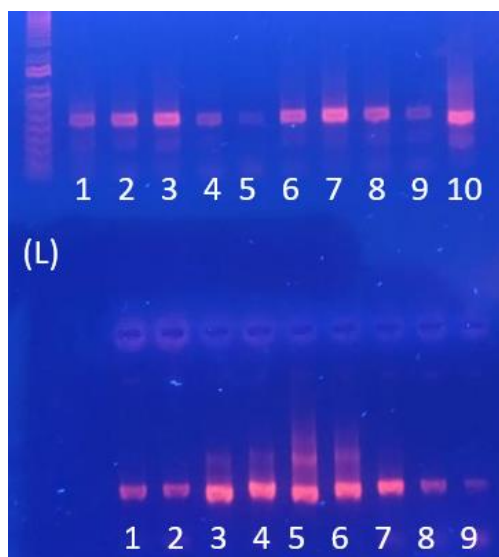


Figura 3. Gel de agarose a 2% com amplificação do gene COI (1-10 coquetel 1 e 1-9 coquetel 2) (L) *Ladder 1Kb plus*. Fragmentos de aproximadamente 450–500 pb.

Preparo da biblioteca

Para o preparo das bibliotecas, utilizamos metodologia similar à proposta pelo guia de preparação da Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) para sequenciamento de amplicons: os fragmentos foram purificados utilizando esferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) de acordo com o protocolo do fabricante e então o DNA foi ressuspendido em 50µL de Tris-HCl 10mM (pH 8,5). Todos os amplicons purificados foram duplamente indexados com o Nextera Index Kit (Illumina), Index 1 (N7XX) e Index 2 (S5XX) e novamente purificados de acordo com protocolo. A reação de indexação foi realizada com 25µL de Master Mix; 5 µL de cada Index (N7XX e S5XX); 10 µL de água ultrapura estéril e um volume de 5µL de DNA, totalizando uma reação de 50µL de volume final e o regime de ciclo aplicado foi: 3 minutos a 95°C, seguido de 8 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C, 30 segundos a 72°C e, em seguida, 5 minutos a 72°C.

Normalização e sequenciamento das amostras

As bibliotecas foram quantificadas utilizando o Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen) com o Kit Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen) e após esta etapa de quantificação, cada amostra teve sua concentração padronizada em 23 ng/µL, e para montagem da biblioteca final foi feito um *pool* utilizando 5 µL somente das amostras que atenderam a concentração estabelecida (Tabela 3). Posteriormente, a biblioteca foi quantificada uma última vez por meio do Qubit e qPCR (Real-time quantitative PCR), a fim de otimizar a geração de clusters.

As bibliotecas foram normalizadas à 10 pM, diluídas em TRIS-HCl 10 nM pH 8.5 com 0.1% de Tween 20, e adicionado 30% de PhiX à 12 pM, para então serem sequenciadas na plataforma MiSeq Illumina com o MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500 ciclos).

final. Todas as amostras (com exceção dos pools 1 e 2) foram padronizadas para uma concentração final de 23 ng/μL.

Identificação	Quantificação Qubit
Pool 1	33 ng/μL
Pool 2	---
Pool 3	---
Pool 4	46 ng/μL
Pool 5	44,55 ng/μL
Pool 6	46,15 ng/μL
Pool 7	29,7 ng/μL
Pool 8¹	62,75 ng/μL
Pool 9¹	63,3 ng/μL
Pool 10	55,25 ng/μL
Pool 11	60 ng/μL
Pool 12	24,75 ng/μL
Pool 13	43,75 ng/μL
Pool 14	35 ng/μL
Pool 15	49,7 ng/μL
Pool 16	33,9 ng/μL
Pool 17	44,85 ng/μL
Pool 18	35,45 ng/μL
Pool 19	49,65 ng/μL
Pool 20	43,15 ng/μL
Pool 21	53,5 ng/μL
Pool 22	38,6 ng/μL
Pool 23	55,96 ng/μL
Pool 24	43 ng/μL
Pool 25	73 ng/μL
Pool 26	57,9 ng/μL
Pool 27¹	41,3 ng/μL
Pool 28¹	50,75 ng/μL
Pool 29¹	70,2 ng/μL
Pool 30	45,9 ng/μL
Pool 31	40,5 ng/μL

Pool 32	46,25 ng/μL
Pool 33	61,5 ng/μL
Pool 34	38,35 ng/μL
Pool 35	19,3 ng/μL
Pool 36	36 ng/μL
Pool 37	37,25 ng/μL

¹ Amostras subdivididas

Análises bioinformáticas

Após a submissão das amostras na plataforma Illumina Miseq, o processamento dos dados brutos obtidos incluiu filtragem por qualidade, onde foram eliminadas as *reads* com QV inferior a 30 e realizado o emparelhamento destas utilizando o Paired-End reAd mergeR (PEAR) v.0.9.5 (ZHANG e colab., 2014), e excluídas as *reads* com menos de 30 pares de bases de sobreposição, e em seguida, foram removidos os *primers* utilizando o software CUTADAPT v.3.4 (MARTIN, 2011) de modo a reduzir as chances de alinhamento entre sequências de diferentes espécies. Posteriormente, foi realizado uma etapa de desreplicação (eliminação de *reads* idênticos; opção - fastx_uniques) e de sequências quimeras (opção -uchime3_denovo), utilizando o algoritmo USEARCH versão 11.0.667 (EDGAR, 2010). Por fim, foi feita a montagem através do programa Geneious versão 8.0.3 (Biomatters Ltd), e os *contigs* obtidos foram confrontados com o banco de dados do NCBI, sendo considerados os *contigs* com 97% ou mais de similaridade.

Resultados

Custos comparativos das abordagens de sequenciamento por Sanger e Illumina Miseq

O sequenciamento de Sanger apresenta menor custo do que o sequenciamento Illumina Miseq, quando realizado para um pequeno número de amostras. O custo do sequenciamento de Sanger pode variar, dependendo de qual forma será realizado (tubos, strips, placas) e dos métodos de purificação das amostras. Com base na metodologia empregada no laboratório, o custo foi de aproximadamente R\$60,76 por organismo, por meio de placa de 96 poços (Tabela 4). A fim de estimar o custo do projeto, o valor de cada organismo foi multiplicado pelo número total de indivíduos sequenciados, sendo que o custo por amostra pago foi de R\$ 10,00.

Para o sequenciamento Illumina Miseq, o custo varia de acordo com o nível de cobertura necessária e da metodologia utilizada para a construção das amostras. Nesse caso, o custo para sequenciar as amostras, utilizando o kit “nano”, capaz de gerar 1 milhão de leituras em 500 ciclos, realizado de forma bi-direcional, com profundidade média de 500x, foi de aproximadamente R\$1,18 por organismo (Tabela 4). A fim de estimar o custo do projeto, o valor de cada organismo foi multiplicado pelo número total de indivíduos sequenciados, sendo que o custo por corrida foi de R\$ 1.000,00. Em relação ao tempo de laboratório necessário para o preparo das amostras, uma placa com 96 amostras, demora pouco menos quando confrontado com a construção de uma biblioteca, todavia, torna-se incomparável as duas metodologias, visto a quantidade de amostras suportada por cada corrida.

Tabela 4. Comparação dos custos de sequenciamento de Sanger *versus* sequenciamento Illumina Miseq. Todos os valores estão em reais.

Método	Número de amostras	Tempo de preparo (horas)	Custo aproximado	Custo estimado projeto
Sanger – placa (96 amostras)	4.297	7.5 por placa	R\$60,76 por organismo	R\$261.085,72
Illumina Miseq	4.297	9.5 por biblioteca	R\$1,18 por organismo	R\$5.070,46

Comparação das métricas esperadas e obtidas

As métricas da corrida usando o kit MiSeq Nano v2 (500 ciclos), que apresenta valores esperados de 1 milhão de sequências por corrida, lidas em paralelo, possibilitaram a obtenção nesse estudo de 687 mil sequências, com um score de qualidade acima de 30 para 84% delas (Tabela 5).

Tabela 5. Análise comparativa entre o rendimento esperado para o kit MiSeq Nano v2 (500 ciclos) e o rendimento obtido.

Parâmetro	Rendimento esperado	Corrida
Kcluster/mm²	1000-1200	700
MReads	1	0,687
MBases	500M	286M
% reads após filtragens*	>70	93
% reads > Q30	>70	84

* Porcentagem referente as *reads* após filtragens pelo PEAR

Sequenciamento Illumina Miseq e identificação de espécies

Dos 37 pools, dois foram descartados por não atingir a concentração de DNA suficiente. Os demais, produziram um total de 683.653 *reads paired-end* pela plataforma Illumina Miseq, tendo uma média de 19.532 *reads* (desvio= 5.887) por pool gerado. Aproximadamente 84% das *reads* atingiram valores com QV acima de 30, e após todas as filtragens, foram mantidas 124.054 *reads*. Cada amostra gerou *reads* pareadas variando de 334 a 11.817 *reads* filtradas (média de 3.544), e obtido fragmentos de 372 pb a 754 pb após as montagens, sendo utilizados somente os fragmentos acima de 600 pb. A riqueza de espécies por *pool* variou de 1 a 6, com média de 4 (Tabela 6).

Tabela 6. *Reads* finais obtidas dos contigs utilizados para cada amostra, em relação ao total das *reads* geradas na corrida.

Pool	Nº de organismos	Nº de reads brutas	Nº de reads por táxon identificado	Contigs* >97%	Nº de táxons
1	11	22553	1234	5	3
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	414	12753	2291	7	3
5	272	15549	2684	5	4
6	305	19092	3790	14	5
7	375	22014	5793	9	4
8¹	160	10944	1042	5	5
9¹	160	19482	2604	8	5
10	53	14401	791	5	1
11	196	18579	3144	13	6
12	28	27248	4878	22	3
13	45	17097	4267	30	3
14	17	22021	7473	28	6
15	46	24635	3985	13	6
16	52	14498	3551	9	6
17	15	29653	12712	35	5
18	18	27915	1572	12	4
19	122	13622	3779	11	4
20	39	15151	4611	8	5
21	70	13953	3345	7	3
22	693	34696	2884	4	4
23	169	15791	1902	10	3
24	56	18516	4300	10	6
25	15	22542	7257	30	5
26	11	19654	6705	21	3
27¹	147	20290	2661	12	10
28¹	147	25671	461	5	10
29¹	147	18184	1257	7	10
30	51	17634	1748	13	6
31	255	9343	334	4	3
32	123	18955	846	4	4
33	31	15609	4682	20	5
34	14	13356	4817	13	5
35	15	31310	597	13	6
36	11	17055	5870	11	6
37	11	23887	4187	9	4

¹Amostras pertencentes ao mesmo *pool* (subdivididas). * Quantidade de contigs (com 600 pares de bases ou mais) que atingiram valores iguais ou superiores a 97% de identificação, quando confrontados com o banco de dados do NCBI.

O sequenciamento das bibliotecas resultou na identificação de 29 táxons, pertencentes a três ordens e dez famílias. Dos 29 táxons, um foi identificado em nível de gênero (*Odontostilbe* spp.) e 28 em nível de espécie (Tabela 7).

Tabela 7. Organismos ictiopânctônicos identificados através do gene COI por meio de DNA

metabarcoding e sequenciamento pela plataforma Illumina Miseq.

TAXA
CHARACIFORMES
Bryconidae
<i>Salminus brasiliensis</i> (Cuvier, 1816)*
Anostomidae
<i>Megaleporinus obtusidens</i> (Valenciennes, 1837)*
<i>Megaleporinus piavussu</i> (Britski, Birindelli e Garavello, 2012)*
<i>Leporinus paranensis</i> Garavello e Britski, 1987
<i>Leporinus octofasciatus</i> Steindachner, 1915
<i>Leporinus friderici</i> (Bloch, 1794)
<i>Schizodon nasutus</i> Kner, 1858
Characidae
<i>Astyanax lacustris</i> (Lütken, 1975)
<i>Astyanax biotae</i> Castro e Vari, 2004
<i>Astyanax trierythropterus</i> Godoy, 1970
<i>Galeocharax gulo</i> (Steindachner, 1879)
<i>Hyphessobrycon eques</i> (Steindachner, 1882)
<i>Piabarchus stramineus</i> (Eigenmann, 1908)
<i>Odontostilbe</i> spp. Cope, 1870
Curimatidae
<i>Steindachnerina insculpta</i> (Fernández-Yépez, 1948)
<i>Cyphocharax naegelii</i> (Steindachner, 1881)
Crenuchidae
<i>Characidium zebra</i> Eigenmann, 1909
Parodontidae
<i>Apareiodon piracicabae</i> (Eigenmann, 1907)
Prochilodontidae
<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)*
PERCIFORMES
Sciaenidae
<i>Plagioscion squamosissimus</i> (Heckel, 1840)
SILURIFORMES
Auchenipteridae
<i>Tatia neivai</i> (Ihering, 1930)
Pimelodidae
<i>Pimelodus fur</i> (Lütken, 1874)
<i>Pimelodus maculatus</i> (Lacepède, 1803)*
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Spix e Agassiz, 1829)*
<i>Sorubim lima</i> (Bloch e Schneider, 1801)*
<i>Iheringichthys labrosus</i> (Lütken, 1874)
<i>Pinirampus pirinampu</i> (Spix e Agassiz, 1829)*
Heptapteridae
<i>Pimelodella meeki</i> Eigenmann, 1910
<i>Phenacorhamdia tenebrosa</i> (Schubart, 1964)

*Espécies migradoras de longa distância

Discussão

Desde a descrição do método de sequenciamento por Sanger, os avanços nos meios de sequenciamento e análises genéticas vêm sendo constantemente aprimorados (SANGER e COULSON, 1975; VAN DIJK e colab., 2018). Ainda nos dias de hoje, o sequenciamento pelo método enzimático, continua sendo considerado uma técnica valiosa e empregada de forma ampla, permitindo o sequenciamento de leituras longas (700pb–800pb), aplicada desde a medicina humana (BECK e colab., 2020) até a identificação de produtos comercializados (LLORI e RODRIGO, 2020). Todavia, como todas as técnicas, o sequenciamento de Sanger apresenta limitações, como dificuldades em analisar frequências alélicas, limitações na montagem de genomas utilizando leituras únicas e, um dos mais relevantes, o alto custo na obtenção de dados em estudos extensivos, ou quando necessário coberturas maiores (MEN e colab., 2008). Levando em consideração que, através do sequenciamento Illumina Miseq, é possível gerar leituras de até 300pb, apresentando baixas taxas de erro e com baixo custo (MCCOY e colab., 2014; PFEIFFER e colab., 2018), nosso estudo utilizou a combinação de *primers* longos (externos) e *primers* curtos (internos), usando leituras *forward* e *reverse*, para obtenção de fragmentos do gene COI que variaram de 372 a 754 pares de bases, após montagens.

A utilização de *primers* visando o gene COI, foi dada principalmente por sua alta resolução na identificação de espécies e pelo banco de dados ser mais completo (RATNASINGHAM e HEBERT, 2007). Todavia, visto que *primers* visando o gene COI apresentam regiões de ligação de *primers* mais variáveis, que acaba acarretando na diminuição de sua especificidade (DEAGLE e colab., 2014), *primers* alternativos, como o 12S, vêm sendo aplicados e obtendo bons resultados na identificação de peixes (MIYA e colab., 2015; VALENTINI e colab., 2016). Diversos trabalhos na área de eDNA (DNA ambiental), tiveram sucesso na aplicação de marcadores de rRNA, na ictiofauna Neotropical (CILLEROS e colab., 2019; SALES e colab., 2020), e atualmente buscam a ampliação do banco de dados (MILAN e colab., 2020). Entretanto, a utilização de marcadores de rRNA pode ter seu desempenho afetado na discriminação de espécies intimamente relacionadas, se

eventualmente os amplicons não forem longos suficientes (BYLEMANS e colab., 2017; MARQUINA e colab., 2019; ZHANG e colab., 2013) . Além disso, a aplicação destes marcadores ainda é dificultada pela falta de banco de dados de referência (STAT e colab., 2017), e se tratando da região Neotropical, onde encontramos grande riqueza de espécies e um banco de dados de sequências composto majoritariamente por COI, levaria a uma alta demanda de sequenciamento para a formação de uma nova base de dados.

Considerando o custo para empregar o sequenciamento de Sanger, levando em consideração desde as etapas de extração, amplificação da região alvo e preparo da biblioteca, o sequenciamento dos 4.297 organismos a 60,76 R\$ cada indivíduo, é muito caro quando comparado ao sequenciamento Miseq a 1,18 R\$ cada indivíduo, de forma que foi possível realizar este estudo com um valor correspondente a 2% do que seria utilizado por meio de sequenciamento de Sanger. Além do fator financeiro, a demanda de tempo em laboratório para estudos utilizando técnicas de NGS são consideravelmente menores. Todavia, quando necessário o sequenciamento de um número pequeno de amostras, a técnica de Sanger ainda apresenta custo inferior, levando em consideração o valor do kit Illumina Miseq “nano” utilizado.

Confrontando os dados obtidos com os parâmetros esperados, observamos que o rendimento de leituras para a corrida foi em torno de 70% da sua capacidade máxima, apresentando leituras que ultrapassaram os 80% do score de qualidade. Todavia, o número de *reads* que foram utilizadas para montagem dos *contigs* identificados, foi em torno de 124.000. A perda de um número significativo dessas *reads*, não parece ter influenciado no número de táxons identificados, sendo possível observar essa perda, em outros trabalhos com ictioplâncton, restando em torno de 9% das *reads* iniciais (DUKE e BURTON, 2020). A diminuição desse número, pode estar relacionada, a normalização da biblioteca final nas concentrações de entrada estabelecidas pela Illumina, sendo importante que as amostras sejam fornecidas em equimolaridade, para melhor rendimento dos dados. Ao decorrer do preparo da biblioteca, foi verificada variação nas concentrações utilizando quantificação fluorométrica pelo Qubit e por meio de PCR em tempo real, ocorrendo diminuição expressiva por meio deste último. Outro fator que pode ter influenciado na geração de uma quantidade expressiva

de dados não correspondentes as nossas amostras, foi a adição de grande quantia de PhiX. Dada a baixa complexidade da biblioteca, devido a possibilidade de um grande número de organismos da mesma espécie, que levaria a um número significativo de leituras com a mesma sequência, foi necessário a adição de uma quantidade considerável de PhiX para criar diversidade, e não interferir no sequenciamento, o que normalmente leva a redução do número de dados utilizáveis (BRONNER e colab., 2016; CHOI e colab., 2014; POTTER e LUO, 2010). Por outro lado, as análises bioinformáticas empregadas também levaram a “diminuição” do número final de *reads*, onde a etapa de desreplicação utilizada pelo algoritmo USEARCH, agrupa sequências idênticas dentro da amostra. Todavia, grande parte dos táxons eliminados eram provenientes de outros locais, o que pode estar relacionado, com uma identificação equivocada, provavelmente causada pela baixa qualidade destas sequências, ou ainda, possível indício de contaminação. Para um melhor gerenciamento dos dados obtidos, a utilização de controles negativos poderiam fornecer maior confiabilidade, sendo uma possível alteração futura a ser implementada.

Das 35 amostras sequenciadas, foram identificados 28 táxons a nível de espécie e um táxon a nível de gênero. A abundância de organismos não refletiu na riqueza de espécies identificadas, sendo possível encontrar até seis táxons em um pool com 11 organismos. A não relação desses dados, pode estar associada as características comportamentais ligadas a reprodução, como a preferência de espécies migradoras por ambientes lóticos (AGOSTINHO e colab., 2008; BAUMGARTNER e colab., 2004), que poderia levar a presença de uma riqueza menor de espécies nestes locais, contudo com altas abundâncias. Como também, o fato das amostragens serem pontuais, ocorrendo num determinado ponto em um determinado momento, mesmo que guiadas por fatores relacionados a desova, ainda pode ocorrer um “desencontro” entre a desova e a captura, já que esta ocorre de forma concentrada, para espécies migradoras de longa distância, dentro de um curto período (LOPES e colab., 2018).

Conclusão

Pode se concluir que a nova metodologia descrita neste trabalho, utilizando o marcador COI e conjuntos de *primers* longos e curtos, possibilitou o emprego do sequenciamento de amostras de ictioplâncton no formato de pools, sendo possível, a discriminação da diversidade em nível de espécie, e a aplicação do sequenciamento para todos os organismos coletados, aumentando as chances de identificação de táxons que ocorrem em menores abundâncias. Desta forma, os principais objetivos propostos, que foi a redução de custos, a diminuição expressiva do tempo de preparo das amostras e a geração de uma grande quantidade de dados, foram alcançados, tornando viável o emprego deste protocolo em estudos ecológicos, auxiliando na determinação de locais de desova de espécies migratórias e ameaçadas, e em estudos extensivos visando levantamento de dados para um manejo correto, ou no desenvolvimento de planos de ação.

Referências bibliográficas

- AGOSTINHO, AA. e PELICICE, FM. e GOMES, LC. **Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries.** Brazilian Journal of Biology, v. 68, n. 4 suppl, p. 1119–1132, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842008000500019&lng=en&tlng=en>.
- ARULANDHU, Alfred J. e colab. **Development and validation of a multi-locus DNA metabarcoding method to identify endangered species in complex samples.** GigaScience, v. 6, n. 10, p. 1–18, 2017.
- BAUMGARTNER, Gilmar e colab. **Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River, Brazil.** Environmental Biology of Fishes, v. 71, n. 2, p. 115–125, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10641-004-0098-z>>.
- BECK, David B. e colab. **Somatic Mutations in UBA1 and Severe Adult-Onset Autoinflammatory Disease .** New England Journal of Medicine, v. 383, n. 27, p. 2628–2638, 2020.
- BOVENDORP, Ricardo S. e colab. **Defaunation and fragmentation erode small mammal diversity dimensions in tropical forests.** Ecography, v. 42, n. 1, p. 23–35, 2019.
- BRONNER, Iraad F. e colab. **Quantitative insertion-site sequencing (QIseq) for high throughput phenotyping of transposon mutants.** Genome Research, v. 26, n. 7, p. 980–989, 2016.
- BURROWS, Makenzie e colab. **DNA barcoding reveals clear delineation between spawning sites for neritic versus oceanic fishes in the Gulf of Mexico.** Fisheries Oceanography, v. 28, n. 2, p. 228–239, 2019.
- BYLEMANS, Jonas e colab. **An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*).** Methods in Ecology and Evolution, v. 8, n. 5, p. 646–655, 2017.
- C. MARIAC, Y. VIGOUROUX, F. DUPONCHELLE, C GARCÍA-DÁVILA, J. NÚÑEZ, E. DESMARAIS, J.F. Renno. **Metabarcoding by capture using a single COI probe (MCSP) to identify and quantify fish species in ichthyoplankton swarms.** PLoS ONE, v. 13, p. 1–15, 2018.
- CANESSA, Stefano e colab. **Planning for ex situ conservation in the face of uncertainty.** v. 30, n. 3, p. 599–609, 2015.
- CHENG, Xinwei e colab. **Biological ingredient analysis of traditional Chinese medicine preparation based on high-throughput.** p. 1–12, 2014.
- CHOI, Jaehyuk e colab. **Identification of PLX4032-resistance mechanisms and implications for**

- novel RAF inhibitors.** *Pigment Cell and Melanoma Research*, v. 27, n. 2, p. 253–262, 2014.
- CHU, Cecilia e colab. **Using DNA Barcodes to Aid the Identification of Larval Fishes in Tropical Estuarine Waters (Malacca Straits , Malaysia).** v. 30, p. 1–15, 2019.
- CILLEROS, Kévin e colab. **Unlocking biodiversity and conservation studies in high-diversity environments using environmental DNA (eDNA): A test with Guianese freshwater fishes.** *Molecular Ecology Resources*, v. 19, n. 1, p. 27–46, 2019.
- CORLETT, Richard T. **and Rewilding in a Changing World.** *Trends in Ecology & Evolution*, v. 31, n. 6, p. 453–462, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.017>>.
- DE CARVALHO, Daniel C. e colab. **Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: The case of the São Francisco River basin.** *Mitochondrial DNA*, v. 22, n. SUPPL. 1, p. 80–86, 2011.
- DE LIMA, Moema Cristina Costa e colab. **Use of dna barcode in the identification of fish eggs in tributaries of the paranapanema river basin.** *Genetics and Molecular Biology*, v. 43, n. 3, p. 1–9, 2020.
- DE MAGALHÃES LOPES, João e colab. **Influence of rainfall, hydrological fluctuations, and lunar phase on spawning migration timing of the Neotropical fish Prochilodus costatus.** *Hydrobiologia*, v. 818, n. 1, p. 145–161, 2018.
- DEAGLE, Bruce E. e colab. **DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: Not a perfect match.** *Biology Letters*, v. 10, n. 9, p. 2–5, 2014.
- DUKE, Elena M. e BURTON, Ronald S. **Efficacy of metabarcoding for identification of fish eggs evaluated with mock communities.** *Ecology and Evolution*, v. 10, n. 7, p. 3463–3476, 2020.
- EDGAR, Robert C. **Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.** *Bioinformatics*, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.
- FERNÁNDEZ-OSUNA, María Alejandra e SCARABOTTI, Pablo Augusto. **Phenotypic plasticity associated to environmental hypoxia in the neotropical serrasalmid Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) (Characiformes: Serrasalminidae).** *Neotropical Ichthyology*, v. 14, n. 2, 2016.
- GALETTI, Mauro e colab. **Functional extinction of birds drives rapid evolutionary changes in seed size.** *Science*, v. 340, n. 6136, p. 1086–1090, 2013.
- GHANBARI, Mahdi e KNEIFEL, Wolfgang e DOMIG, Konrad J. **A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing.** *Aquaculture*, v. 448, p. 464–475, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>>.
- GIBSON, Joel e colab. **Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasystematics.** v. 111, n. 22, p. 8007–8012, 2014.
- GREEN, M.R. e SAMBROOK, J. **Manual, Molecular Cloning: A Laboratory.** 4. ed. Cold Spring

- Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- HEBERT, Paul D N e colab. **Biological identifications through DNA barcodes**. n. September 2002, p. 313–321, 2003.
- HEMPEL, G. **Fish eggs and larval studies (Contributions to a manual)**. FAO - Fish Technical Paper, v. 122, p. 82, 1973.
- IVANOVA, Natalia V. e colab. **Universal primer cocktails for fish DNA barcoding**. Molecular Ecology Notes, v. 7, n. 4, p. 544–548, 2007.
- Ji, Yinqiu e colab. **Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding**. Ecology Letters, v. 16, n. 10, p. 1245–1257, 2013.
- KIMMERLING, Naama e colab. **Quantitative species-level ecology of reef fish larvae via metabarcoding**. Nature Ecology and Evolution, v. 2, n. 2, p. 306–316, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41559-017-0413-2>>.
- LLORI, L., & RODRIGO, J. L. **La Molina Molina**. 2020. 2020.
- MAGGIA, M. E. e colab. **DNA Metabarcoding of Amazonian Ichthyoplankton Swarms**. PLOS ONE, v. 12, n. 1, p. e0170009, Jan 2017.
- MARQUINA, Daniel e ANDERSSON, Anders F. e RONQUIST, Fredrik. **New mitochondrial primers for metabarcoding of insects, designed and evaluated using in silico methods**. Molecular Ecology Resources, v. 19, n. 1, p. 90–104, 2019.
- MARTIN, Marcel. **Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads**.
- MARTIN, Tara G e colab. **Prioritizing recovery funding to maximize conservation of endangered species**. n. August, p. 1–9, 2018.
- MCCOY, Rajiv C. e colab. **Illumina TruSeq synthetic long-reads empower de novo assembly and resolve complex, highly-repetitive transposable elements**. PLoS ONE, v. 9, n. 9, 2014.
- MEN, Artem E. e colab. **Sanger DNA Sequencing**. Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine, p. 1–11, 2008.
- MILAN, David T. e colab. **New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment**. Scientific Reports, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74902-3>>.
- MIYA, M. e colab. **MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species**. Royal Society Open Science, v. 2, n. 7, 2015.
- MOREIRA, Leonardo F.B. e colab. **Effects of exotic pastures on tadpole assemblages in Pantanal floodplains: Assessing changes in species composition**. Amphibia Reptilia, v. 37, n. 2, p. 179–190, 2016.

- NICK M. HADDAD, LARSA. BRUDVIG, JEAN CLOBERT, KENDI F. DAVIES, ANDREW GONZALEZ, ROBERT D. HOLT, THOMAS E. LOVEJOY, JOSEPH O. SEXTON, MIKE P. AUSTIN, CATHY D. COLLINS, WILLIAM M. COOK, ELLEN I. DAMSCHEN, ROBERT M. EWERS, BRYAN L. FOSTER, CLINTON N. JENKINS, John R. Townshend. **Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems.** Sciece Advences, v. 1, p. 1–9, 2015.
- NOBILE, A. B. e colab. **DNA metabarcoding of Neotropical ichthyoplankton: Enabling high accuracy with lower cost.** Metabarcoding and Metagenomics, v. 3, Set 2019.
- NOVACEK, Michael J e CLELAND, Elsa E. **The current biodiversity extinction event : Scenarios for mitigation and recovery.** v. 98, n. 10, 2001.
- NOVÁK, Petr e NEUMANN, Pavel e MACAS, Jiří. **Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data.** p. 1–12, 2010.
- OECD. **OECD Environmental Outlook to 2050: the consequences of inaction.** . Paris: [s.n.], 2012.
- PEDERSEN, Henrik Æ e colab. **Phylogenetics of Dendrochilum (Orchidaceae): Evidence of pronounced morphological homoplasy and predominantly centric endemism.** v. 68, n. December 2019, p. 1173–1188, 2020.
- PEREIRA, Luiz Henrique Garcia. **Identificação Molecular dos peixes da bacia do Alto Rio Paraná.** p. 162, 2011.
- PÉREZ-IGLESIAS, Juan Manuel e colab. **Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran Leptodactylus latinasus.** Environmental Science and Pollution Research, v. 23, n. 10, p. 9852–9861, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>>.
- PFEIFFER, Franziska e colab. **Systematic evaluation of error rates and causes in short samples in next-generation sequencing.** Scientific Reports, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.
- PINTO, Angela Di e colab. **Species identification in fish fillet products using DNA barcoding.** Fisheries Research, v. 170, p. 9–13, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2015.05.006>>.
- PORTER, Teresita M e HAJIBABAEI, Mehrdad. **Automated high throughput animal CO1 metabarcoding classification.** Scientific Reports, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22505-4>>.
- POTTER, Christopher J. e LUO, Liqun. **Splinkerette PCR for mapping transposable elements in Drosophila.** PLoS ONE, v. 5, n. 4, p. 1–9, 2010.
- RATNASINGHAM, Sujeevan e HEBERT, Paul D.N. **BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding.** Molecular Ecology Notes, v. 7, n. 3, p. 355–364, 2007.
- SALES, Naiara Guimarães e colab. **Space-time dynamics in monitoring neotropical fish**

- communities using eDNA metabarcoding.** bioRxiv, p. 1–38, 2020.
- SANGER, F. e COULSON, A. R. **A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.** Journal of Molecular Biology, v. 94, n. 3, p. 441–448, 1975.
- SERRANO, Érica e colab. **Species delimitation in Neotropical fishes of the genus.** n. May 2018, p. 69–80, 2019.
- SHOKRALLA, Shadi e colab. **Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research.** Molecular Ecology, v. 21, n. 8, p. 1794–1805, 2012.
- SOGIN, Mitchell L e colab. **Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”.** n. 30, 2006.
- STAT, Michael e colab. **Ecosystem biomonitoring with eDNA : metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment.** Scientific Reports, n. September, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12501-5>>.
- TABERLET, Pierre e COISSAC, Eric. **Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding.** v. 33, p. 2045–2050, 2012.
- UFFE N. NIELSEN AND DIANA H. WALL. **The future of soil invertebrate communities in polar regions : different climate change responses in the Arctic and Antarctic ?** Ecology Letters, v. 16, p. 409–419, 2013.
- VALENTINI, Alice e colab. **Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding.** Molecular Ecology, v. 25, n. 4, p. 929–942, 2016.
- VALLADARES, Graciela e SALVO, Adriana e CAGNOLO, Luciano. **Habitat fragmentation effects on trophic processes of insect-plant food webs.** Conservation Biology, v. 20, n. 1, p. 212–217, 2006.
- VAN DIJK, Erwin L. e colab. **The Third Revolution in Sequencing Technology.** Trends in Genetics, v. 34, n. 9, p. 666–681, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>>.
- WARD, R. D. e colab. **DNA barcoding Australia’s fish species.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 360, n. 1462, p. 1847–1857, Out 2005.
- WEEKS, Andrew R e colab. **Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments : a genetic perspective.** v. 4, p. 709–725, 2011.
- WICKER, Thomas e colab. **A unified classification system for eukaryotic transposable elements.** Nature reviews, v. 8, n. december, p. 973–982, 2007.
- ZHANG, Jiajie e colab. **A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements.** Bioinformatics, v. 29, n. 22, p. 2869–2876, 2013.
- ZHANG, Jiajie e colab. **Genome analysis PEAR : a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR.** Oxford University Press, v. 30, n. 5, p. 614–620, 2014.

Capítulo 2

Caracterização da distribuição espaço-temporal de ovos e larvas de peixes no rio Mogi-Guaçu através de análises moleculares

Resumo

O ecossistema formado pelos rios Mogi-Guaçu, Pardo e Grande se encontra inserido em uma das áreas mais desenvolvidas do país, o que impulsionou a construção de muitas hidrelétricas nas últimas décadas. Estes empreendimentos promovem diversas alterações ambientais, que incidem diretamente na ictiofauna local, principalmente em espécies com hábitos migratórios, levando muitas vezes, a extinção destas. A identificação correta de ovos e larvas, têm se apresentado como ferramenta valiosa na ecologia e conservação de peixes, viabilizando o reconhecimento de locais de desova e crescimento, e conseqüentemente, auxiliando em planos de manejo e preservação destas espécies. Entretanto, esta identificação é realizada, tradicionalmente, por meio de aspectos morfológicos e anatômicos, e devido a escassez destes, a identificação muitas vezes fica limitada a nível de ordem e família, resultando na ausência de dados relevantes. Considerando este cenário, o presente estudo, utilizou a técnica de DNA *barcoding* e *metabarcoding*, para identificação do ictioplâncton, a fim de identificar quais espécies se reproduzem nestes locais e a possível existência de áreas preferenciais de desova e crescimento. Foram conduzidas coletas em seis pontos amostrais abrangendo dois períodos reprodutivos (dezembro de 2017 a fevereiro de 2018 e novembro de 2018 a fevereiro de 2019), totalizando a captura de 5.125 organismos ictioplanctônicos (3.567 ovos e 1.558 larvas), sendo o ictioplâncton identificado totalmente com técnicas moleculares. Foi possível a identificação de 35 táxons, sendo 33 identificados em nível de espécie e dois em nível de gênero, tendo destaque para presença de oito espécies migradoras de longa distância. Foram observadas áreas de desova nos pontos de montante e berçário, nos pontos de jusante, com maiores densidades de ictioplâncton no mês de janeiro de ambos os ciclos. A densidade de ovos e larvas apresentou correlação positiva com precipitação e vazão. Houveram diferenças na composição de espécies entre os pontos amostrais, com maior presença de ovos e larvas de migradores de longa distância nos pontos P3 e P6, sendo *Prochilodus lineatus* e *Pimelodus maculatus* as mais abundantes. Conclui-se que o rio Mogi-Guaçu é um importante sítio reprodutivo para diversas espécies, com destaque para migradores de longa distância.

Palavras-chave: Conservação de peixes, áreas de várzea, DNA *metabarcoding*.

Abstract

The ecosystem formed by the Mogi-Guaçu, Pardo and Grande rivers is located in one of the most developed areas in the country, which has promoted the construction of many hydroelectric dams in recent decades. These developments promote several environmental changes, which directly affect the local ichthyofauna, mainly species with migratory habits, often leading to their extinction. The correct identification of eggs and larvae has been presented as a valuable tool in the ecology and conservation of fish, enabling the recognition of spawning and growth sites, and, consequently, assisting in the management and preservation plans of these species. However, this identification is traditionally carried out through morphological and anatomical aspects, and due to their scarcity, identification is often limited to the order and family level, resulting in the absence of relevant data. Considering this scenario, the present study used the DNA barcoding and metabarcoding technique to identify the ichthyoplankton, in order to identify which species, reproduce in these sites and the possible existence of preferred spawning and growth areas. Catches were conducted in six sample points covering two reproductive periods (December 2017 to February 2018 and November 2018 to February 2019), totaling the capture of 5,125 ichthyoplanktonic organisms (3,567 eggs and 1,558 larvae), with the ichthyoplankton being fully identified with molecular techniques. It was possible to identify 35 taxa, 33 of which were identified at the species level and two at the genus level, with emphasis on the presence of eight long-distance migratory species. Spawning areas were observed at the upstream and nursery points, at the downstream points, with higher ichthyoplankton densities in the month of January of both cycles. The density of eggs and larvae showed a positive correlation with precipitation and flow. There were differences in species composition between the sampling points, with a greater presence of eggs and larvae of long-distance migrants at points 3 and 6, with *Prochilodus lineatus* and *Pimelodus maculatus* being the most abundant. Our results indicate the Mogi-Guaçu River as an important reproductive site for several species, especially long-distance migrants.

Key-words: Fish conservation; Floodplain; DNA *metabarcoding*.

Introdução

Os ecossistemas de água doce são considerados um dos ambientes mais impactados do mundo, possuindo as maiores proporções de extinção registradas (COLLEN e colab., 2014). Pode-se relacionar estes números ao fato da água ser empregada como propulsora do avanço social e econômico, utilizada para o consumo e produção de alimentos, bem como geradora de energia (WORLD BANK, 2016), sendo que 50% da superfície de água doce total disponível, foram tomadas para estes fins (IWASAKI e colab., 2012). Atualmente existem aproximadamente 60.500 barragens de grande porte ao redor do mundo (AQUASTAT, 2017; ICOLD, 2017; ZARFL e colab., 2015), e cerca de 80.000 represas de pequeno porte em córregos e tributários (BURCHSTED e DANIELS, 2014; COUTO e OLDEN, 2018). Estas barragens resultam em alterações do fluxo natural dos rios e impactam negativamente diversos organismos aquáticos (DUDGEON, 2014), sendo os peixes, o grupo de organismos mais prejudicados por estas atividades. O Brasil, em virtude de possuir grandes bacias hidrográficas, detém 12% das reservas de água doce do mundo (FAO/OECD, 2015), de forma que as hidrelétricas representam a principal matriz energética do país (BIG-ANEEL, 2017; ZARFL e colab., 2015). Desta forma, a ictiofauna brasileira é uma das mais impactadas, sendo também, uma das mais ricas, com cerca de 3.148 espécies (MMA, 2018) pertencentes ao grupo de peixes dulcícolas neotropicais, que somadas a todas as descrições do continente, totalizam cerca de 5.160 espécies, quais ocupam variados sistemas fluviais e regiões ecológicas ao redor do mundo (REIS e colab., 2016).

Sendo assim, apesar de ser considerada uma fonte de energia limpa, a construção de hidrelétricas causa diversos impactos sobre o ecossistema (ATHAYDE e colab., 2019), dentre os quais, podemos destacar, a interrupção do fluxo de água e sedimentação (ANDERSON e colab., 2018), que podem levar a diminuição da disponibilidade de nutrientes nas áreas de várzea (ZAHAR e colab., 2008), como também, alteração das condições físico-químicas da água, e modificações da morfologia de rios (LOBATO e colab., 2015). Essas alterações, levam a mudanças nos padrões espaço-temporais de comunidades de peixes (ARAÚJO e colab., 2013; BARTHEM e colab., 1991;

FORSBERG e colab., 2017; NOBILE, e colab., 2019), afetando principalmente espécies reofílicas, as quais dependem do ciclo da água (DE LIMA e colab., 2017) e manutenção da conectividade do rio para se reproduzir (ANDERSON e colab., 2018). Além disso, a alteração nos pulsos de inundação, gerada pela regulação da vazão dos rios barrados, afeta de forma incisiva em um dos gatilhos ambientais necessários para dar início ao processo de migração, provocando alterações na dinâmica hidrológica natural e variáveis limnológicas (AGOSTINHO e colab., 2004; NILSSON e colab., 2005; SANCHES e colab., 2006), levando à diminuição da biodiversidade encontrada impedindo a troca de água, nutrientes e organismos entre os habitats de canal e planície de inundação (JUNK e colab., 1989), tornando perceptível a alteração de densidade das espécies migradoras pré e pós fechamento de barragem (SANCHES e colab., 2006).

Diante deste cenário, diversas formas de atenuar os impactos gerados por esses empreendimentos foram adotados, a fim de reestabelecer rotas migratórias e o fluxo entre ambientes que sofreram restrição por impedimentos físicos (POMPEU e colab., 2012). Estão inclusos nessas medidas de mitigação, a implementação de sistemas de transposição de peixes (STP), como de escadas, canais seminaturais e elevadores (BAUMGARTNER e colab., 2018; LIRA e colab., 2017), todavia, com eficiência questionada (LIRA e colab., 2017; OLDANI e colab., 2007; POMPEU e colab., 2012), bem como programas de “reprodução de suporte” (WANG e RYMAN, 2001), visando a reprodução de espécies nativas em cativeiro para posterior repovoamento. Deste modo, uma das melhores formas de mitigar as consequências geradas pelos barramentos sobre a ictiofauna, ainda é a manutenção de tributários livres, que além de servir como rotas alternativas ao processo migratório, apresentam locais de desova e crescimento apropriados para as fases iniciais de vida dos peixes, fundamentado nas altas densidades de ictioplâncton encontrados nestes locais em período reprodutivo (DA SILVA e colab., 2015; 2019; CAVARETTO, 2019).

Estudos buscando identificar áreas prioritárias à conservação são fundamentais para redução e gerenciamento de ameaças à biodiversidade, sendo no caso de peixe, frequentemente realizados com a identificação do ictioplâncton, capazes de gerar dados sobre locais e épocas preferenciais para reprodução, assim como, mensurar o sucesso de recrutamento e determinar possíveis rotas

migratórias (BAUMGARTNER e colab., 2004; BIALETZKI e colab., 2005; REYNALTE-TATAJE e colab., 2011). Entretanto, em virtude da escassez de caracteres diagnósticos nas fases iniciais, principalmente em ovos (BAUMGARTNER e colab., 2004; REYNALTE-TATAJE e colab., 2012), a identificação tradicional muitas vezes fica limitada a nível de ordem e família (NAKATANI e colab., 2001). Desta forma, a utilização de ferramentas moleculares, como a técnica de DNA *barcoding* proposta por HEBERT e colaboradores (2003), surgiu como alternativa para essas limitações, e atualmente se encontra amplamente utilizada e estabelecida na literatura, sendo eficiente na identificação de ictioplâncton marinho (KO e colab., 2013; LEWIS e colab., 2016), como também de água doce (BECKER e colab., 2015; FRANTINE-SILVA e colab., 2015).

Todavia, com o grande número de organismos ictioplanctônicos coletados e a necessidade de identificação total das amostras, atrelada ao avanço da biologia molecular e, consequentemente, das plataformas de sequenciamento (VAN DIJK e colab., 2018), foi possível a implementação de novas técnicas de identificação baseadas em sequenciamento de nova geração, como o DNA *metabarcoding*, permitindo a produção de trabalhos extensos com menor custo-benefício e tempo dispendido (GHANBARI e colab., 2015; NOBILE e colab., 2019; NOVÁK e colab., 2010; TABERLET e COISSAC, 2012; WICKER e colab., 2007). Sendo assim, baseado nas necessidades de estudos relacionados à conservação de espécies reofílicas e tendo como ferramenta de análise a genética molecular, com maior precisão de identificação, este trabalho teve como propósito, 1) identificar as espécies que se reproduzem no rio Mogi-Guaçu, 2) avaliar distribuição espaço-temporal dos ovos e larvas, 3) avaliar a influência da precipitação e da vazão nos processos de desova e 4) identificar se há diferentes locais preferenciais para desova e crescimento.

Material e métodos

Área de estudo

O rio Mogi-Guaçu se encontra localizado na região nordeste do estado de São Paulo e sudoeste do estado de Minas Gerais, fazendo parte da bacia do Alto rio Paraná, desaguardo no rio Pardo (SP), sendo estes, afluentes da margem esquerda do rio Grande (ESPÍNDOLA e colab., 2003).

A bacia hidrográfica do Mogi-Guaçu apresenta papel importante na reprodução de peixes, servindo como rio de desova e fornecendo rotas alternativas ao processo migratório (GODOY, 1954). Nota-se ainda, a presença de dois barramentos no leito principal, uma Usina hidrelétrica (UHE Mogi-Guaçu) localizada na porção superior desse rio, e uma Pequena Central Hidroelétrica (PCH Emas), localizada no trecho médio, que se encontra desativada, contudo, com a barragem e a escada para peixes presentes.

Coleta do material biológico

Como diversos trabalhos têm demonstrado, o período mais propício para o desenvolvimento de estudos relacionados ao ictioplâncton é de novembro a fevereiro, em sincronia com a estação chuvosa (AMAZON e colab., 2017; BARZOTTO e MATEUS, 2017; GARCIA e colab., 2018; OLIVEIRA e colab., 2010), período no qual as coletas de ovos e larvas foram realizadas, mensalmente, ao longo de dois ciclos reprodutivos (2017/2018 e 2018/2019). Foram realizadas amostragens em seis pontos (Ponto 1 a Ponto 6), distribuídos longitudinalmente no eixo do rio Mogi-Guaçu, localizados em corredeiras e áreas de várzea. Destes pontos, os três primeiros estão situados numa área onde o rio apresenta-se encaixado, sendo um localizado cerca de 20 km a montante do eixo da barragem da PCH de Emas (Ponto 1) e dois pontos a jusante, um localizado imediatamente abaixo da barragem (Ponto 2) e outro cerca de 15 km, numa corredeira presente numa laje de pedra (pedral) (Ponto 3). Os demais pontos estão situados numa área meândrica do rio Mogi-Guaçu, com presença de lagoas marginais (Ponto 4, 5 e 6), localizando-se a aproximadamente 100 km a jusante do Ponto 3, com distância aproximada de 40 km entre o Ponto 4 e o Ponto 6 (Figura 4; Tabela 8). Em termos de extensão, foram avaliados cerca de 175 km de trecho de rio.

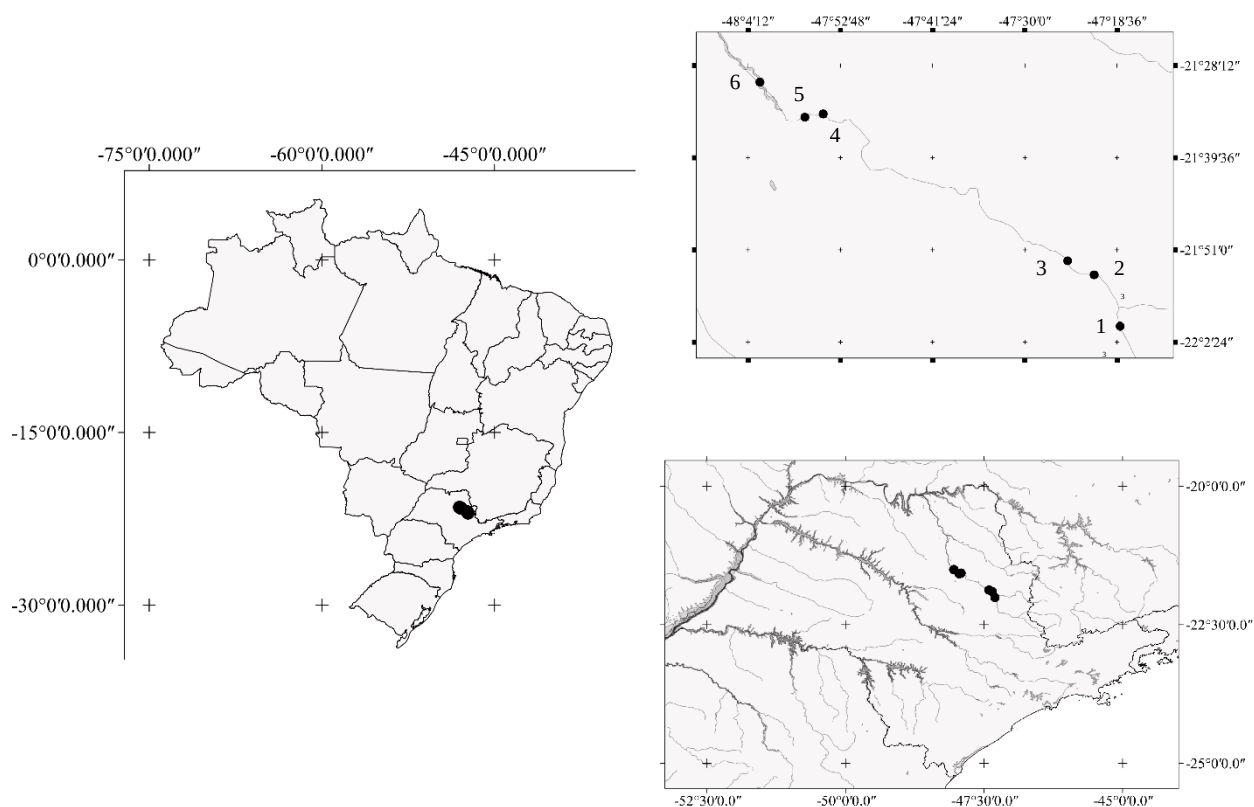


Figura 4. Pontos de amostragem de ictioplâncton localizados no rio Mogi-Guaçu, SP.

Tabela 8. Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem de ictioplâncton distribuídos no gradiente longitudinal do rio Mogi-Guaçu, SP, Brasil.

Ponto	Ambiente	Latitude	Longitude
1	Montante	21°58'10.70"S 47°	16'8.52"O
2	Jusante	21°55'33.34"S 47°	22'12.53"O
3	Jusante	21°51'13.30"S 47°	26'35.43"O
4	Várzea	21°35'4.95"S 47°	55'23.12"O
5	Várzea	21°35'28.48"S 47°	57'13.71"O
6	Várzea	21°30'12.20"S 48°	2'27.52"O

Amostragem de ictioplâncton

As coletas foram realizadas com rede de plâncton do tipo cônico-cilíndrica, com malha de 0,5 mm e área da boca de rede de 0,1104 m² com fluxômetro General OceanicsTM acoplado à boca, para obtenção do volume de água filtrada. Todas as coletas foram realizadas durante o período noturno, entre 19:00 e 3:00 horas, visto que trabalhos como de ZOCCAL GARCIA e colab. (2018), apontaram densidades larvais maiores ao anoitecer, além disso, como todos os ambientes são lóticos, a rede foi mantida estacionária à subsuperfície da água contra a correnteza por um intervalo de 10 minutos. O material obtido em campo foi imerso em solução de eugenol (4%), a fim de anestesiá-los os organismos capturados, e posteriormente, acondicionado em álcool 96% e armazenado em freezer a -20°C. Em laboratório, o material foi triado em esteromicroscópio, sendo agrupado em ovos ou larvas, a fim de explorar melhor os resultados ecológicos, visto que espécies migradoras de longa distância, geralmente apresentam áreas diferentes para desova e crescimento, e estas informações apresentam grande importância na tomada de decisões visando a conservação destas. Para amostras com quantidades menores ou iguais a 10 indivíduos, foi optada a aplicação da técnica de DNA *barcoding*, visto que a utilização da técnica de DNA *metabarcoding* levaria a um aumento razoável do número de tubos para extração fenólica elevando o tempo desta, além disso, a proximidade e a possibilidade em se realizar o sequenciamento no próprio laboratório, motivou a aplicação do método de Sanger em busca de diminuir o número de amostras com quantidades baixas de organismos.

Análises moleculares

DNA *barcoding*

Para os estudos moleculares, foram analisados 5.125 organismos ictioplânctônicos (ovos=3.569; larvas=1.558). Nas amostras com menos de 10 organismos por mês/ponto, as quais totalizaram 112 indivíduos (ovos=53; larvas=59), foi realizada extração de DNA total seguindo o protocolo da Canadian Centre for DNA Barcoding (CCDB), proposto por IVANOVA e

GRAINGER (2014). As reações de amplificação do gene COI, foram realizadas com o Kit OneTaq™ Hot Start (BioLabs), e para a amplificação e sequenciamento dos segmentos foram utilizados os *primers* FishF1 e FishR1, descritos por WARD e colaboradores (2005). Os produtos amplificados foram purificados através do kit ExoSap-IT® (USB Corporation), seguindo os procedimentos sugeridos pelo fabricante, e visualizados em gel de agarose a 1%. Posteriormente, o DNA foi sequenciado com o uso do kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems®), através da metodologia de Sanger.

DNA metabarcoding

Dos 5.013 organismos restantes (ovos=3.514 e larvas=1499), 4.297 foram submetidos a técnica de DNA *metabarcoding* (*pools* que não atingiram concentrações suficientes de DNA foram removidos). Para isso, os ovos e larvas foram agrupados em *pools* contendo apenas ovos ou larvas, sendo que nas amostras com mais de 200 larvas, foram criados *subpools*, totalizando 37 *pools* montados com os organismos coletados (Tabela 9).

A extração do DNA total dos ovos e larvas foi realizada de acordo com o protocolo adaptado de GREEN e SAMBROOK (2012) (detalhado no capítulo 1), utilizando proteinase K e fenol clorofórmio. Para a amplificação e sequenciamento do gene citocromo C oxidase subunidade I (COI), foram utilizados dois conjuntos de *primers*: FishF1+FishF2+FishF6+433R+432+434R e FishR1+FishR2+FishR7+219F+217F+214F, sendo FishF1/R1 e FishF2/R2, descritos na literatura (JENNINGS e colab., 2019; WARD e colab., 2005), e os demais desenhados em nosso laboratório. Posteriormente, as amostras foram agrupadas e os passos seguintes de limpeza, indexação e montagem de bibliotecas, foram realizados seguindo os passos descritos no guia de preparação da Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library. Em seguida, as amostras foram sequenciadas em um sequenciador automático de nova geração MiSeq da Illumina.

Tabela 9. Relação dos *pools* de organismos feitos com os ovos e larvas capturados nos diferentes pontos e meses de amostragem de ictioplâncton no rio Mogi-Guaçu, SP.

Pool	Ponto de coleta	Data	Quantidade	Organismo
------	-----------------	------	------------	-----------

1	6	dez/17	11	ovos
<u>2</u>	2	dez/17	13	ovos
<u>3</u>	4	jan/18	703	ovos
4	1	jan/18	414	ovos
5	6	jan/18	272	ovos
6	2	jan/18	305	ovos
7	3	jan/18	375	ovos
8*	6	jan/18	160	larvas
9*	6	jan/18	160	larvas
10	3	jan/18	53	larvas
11	2	jan/18	196	larvas
12	2	fev/18	28	ovos
13	4	fev/18	45	ovos
14	4	nov/18	17	ovos
15	2	nov/18	46	ovos
16	6	nov/18	52	ovos
17	5	dez/18	15	ovos
18	3	dez/18	18	ovos
19	1	jan/19	122	ovos
20	5	jan/19	39	ovos
21	2	jan/19	70	ovos
22	4	jan/19	693	ovos
23	3	jan/19	169	ovos
24	6	jan/19	56	ovos
25	1	jan/19	15	larvas
26	4	jan/19	11	larvas
27*	6	jan/19	147	larvas
28*	6	jan/19	147	larvas
29*	6	jan/19	147	larvas
30	5	jan/19	54	larvas
31	2	jan/19	255	larvas
32	3	jan/19	123	larvas
33	5	fev/19	31	ovos
34	4	fev/19	14	ovos
35	6	fev/19	15	ovos
36	1	fev/19	11	ovos
37	3	fev/19	11	ovos

*asteriscos sequenciais indicam subpools; pools sublinhados = excluídos das análises moleculares.

Análises ecológicas

As espécies foram classificadas com relação ao comportamento migratório e origem, utilizando literatura específica (LANGEANI, 2007; OTA e colab., 2018; VASCONCELOS e

colab., 2014). Para as análises, as amostras foram padronizadas para um volume de 10 m³ de água filtrada (NAKATANI e colab., 2001; TANAKA, 1973), sendo que o volume de água filtrada foi em média de 57,34 litros, estimado como o produto da área da boca da rede, o número de rotações do medidor de vazão e o fator de calibração do medidor de vazão.

A fim de delimitar áreas de desova e crescimento preferências, as densidades de ovos e larvas, foram testadas usando a análise ANOVA Two-Way, tendo como fatores, local (Pontos 1 a 6) e meses (novembro a fevereiro). A análise foi realizada para densidades de ovos e larvas separadamente, e os dados foram transformados em Log (x+1).

Para avaliar a influência da precipitação e da vazão sobre as densidades de ovos e larvas, a precipitação e a vazão para os meses e pontos de estudo foram obtidas no link (<http://www.snirh.gov.br/hidrotelemetria/Estacoes.aspx#>), da Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA), sendo utilizadas estações meteorológicas distintas (Ponto P1: 22° 1'30.00"S; 47°16'55.20"O, Pontos P2 e P3: 21°54'36.00"S; 47°23'52.80"O, Pontos P4 a P6: 21°50'45.60"S; 47°28'26.40"O), de acordo com a proximidade das mesmas com os pontos amostrais, e por fim, gerado um gráfico com as médias entre elas. Os valores de precipitação e vazão foram correlacionados à densidade de ovos e larvas, considerando os seguintes períodos; média dos 5 dias antes das amostragens, média dos 4 dias antes das amostragens, média dos 3 dias antes das amostragens, média dos 2 dias antes das amostragens, 1 dia antes das amostragens e no dia da amostragem, e realizada Correlação de Spearman para cada ciclo separadamente (ovos e larvas foram transformados em Log (x+1)).

Para avaliar a estrutura da comunidade e também a existência de áreas preferencias para determinadas espécies, foi realizado um Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS), para visualizar a distribuição da estrutura das assembleias de larvas e ovos em relação aos fatores espaciais e temporais. Foi feita uma análise de variância multivariada por meio de permutações (PERMANOVA), com intuito de verificar a ocorrência de diferenças na composição da comunidade de ovos e larvas, e para testar diferenças entre os fatores avaliados e a interação entre eles. Sempre que encontradas diferenças significativas, foi aplicada uma PERMANOVA pairwise.

Por fim, para os fatores que apresentaram diferenças, foi realizada uma análise de porcentagem de similaridade (SIMPER) (CLARKE e GORLEY, 2006), para determinar a contribuição de cada espécie na dissimilaridade média entre as variáveis. Foi utilizada para todas as análises multivariadas acima, o software Primer 6.0 (ANDERSON e colab., 2008).

Análises bioinformáticas

Após a submissão das amostras na plataforma Illumina Miseq, o processamento dos dados brutos obtidos incluiu filtragem por qualidade, onde foram eliminadas as reads com QV inferior a 30 e realizado o emparelhamento destas utilizando o Paired-End reAd mergeR (PEAR) v.0.9.5 (ZHANG e colab., 2014). Após, foram excluídas as reads com menos de 30 pares de bases de sobreposição, e em seguida, foram removidos os *primers* utilizando o software CUTADAPT v.3.4 (MARTIN, 2011), de modo a reduzir as chances de alinhamento entre sequências de diferentes espécies. Posteriormente, foi realizada uma etapa de dereplicação (eliminação de *reads* idênticas; opção -fastx_uniques) e eliminação de sequências quimeras (opção -uchime3_denovo), utilizando o algoritmo USEARCH versão 11.0.667 (EDGAR, 2010). Por fim, foi feita a montagem através do programa Geneious versão 8.0.3 (Biomatters Ltd), e os contigs obtidos foram confrontados com o banco de dados do NCBI, sendo considerados os contigs com 97% ou mais de similaridade.

Resultados

DNA *barcoding* e *metabarcoding*, caracterização e distribuição do ictioplâncton

No total, foram capturados 5.125 indivíduos ictioplanctônicos, sendo 3.567 ovos e 1.558 larvas. Com a padronização em indivíduos/10m³, a densidade média de ovos capturados foi 37,07 ind./10m³ e de larvas foi 5,89 ind./10m³ (Tabela 10).

Tabela 10. Densidade média de ovos e larvas por ciclo reprodutivo e pontos de amostragem de ictioplâncton no rio Mogi-Guaçu, SP.

Densidade média ovos (ind./10m ³)	Densidade média larvas	Desvio Padrão (Ovos)	Desvio Padrão (Larvas)
--	---------------------------	-------------------------	---------------------------

	(ind./10m ³)			
Ciclo 1	40,61	5,66	126,20	10,55
Ponto 1	0	0	0	0
ponto 2	16,44	0	28,24	0
ponto 3	37,41	0,25	57,45	0,17
ponto 4	12,91	7,12	17,61	12,32
ponto 5	88,42	14,39	148,45	20,55
ponto 6	8,58	8,75	12,29	14,44
Ciclo 2	39,92	6,34	126,60	11,16
Ponto 1	25,51	6,94	43,87	8,50
Ponto 2	37,25	4,94	72,54	8,70
Ponto 3	185,34	3,20	365,61	5,64
Ponto 4	5	8,80	5,77	16,65
Ponto 5	9,85	7	17,05	13,62
Ponto 6	8,08	3,47	3,65	15,36
Dez/17	0,99	0,62	0,98	1,20
Jan/18	78,07	14,22	95,60	16,38
Fev/18	2,82	0,41	3,29	0,80
Nov/18	4,08	0,61	4,63	0,59
Dez/18	1,49	0,37	1,30	0,54
Jan/19	155,94	21,97	288,18	10,20
Fev/19	16,10	3,03	36,77	7,16

A utilização das técnicas moleculares de DNA *barcoding* e *metabarcoding*, foram aplicadas em 4.409 organismos capturados, resultando na identificação de 35 táxons, pertencentes a quatro ordens e 13 famílias. Dos táxons identificados, dois atingiram nível de gênero (*Bryconamericus* spp. e *Odontostilbe* spp.) e 33 nível de espécie (Tabela 11). Quanto ao comportamento reprodutivo, oito espécies foram consideradas de longa migração (LEM), 26 como espécies migradoras de curta distância e/ou sedentárias (NEW) e uma espécie não migrante ou migradora de curta distância com cuidado parental (NEP). Apenas duas espécies foram classificadas como alóctones para a bacia do rio Mogi-Guaçu (*Plagioscion squamosissimus* e *Sorubim lima*) (DA GRAÇA e PAVANELLI, 2007; LANGEANI, 2007).

Tabela 11. Espécies de peixes identificadas via DNA *barcoding* e *metabarcoding* a partir de amostras de ictioplâncton coletadas no rio Mogi-Guaçu, SP.

TAXA	GUILDA REPRODUTIVA*	Ovo	Larva
------	------------------------	-----	-------

CHARACIFORMES				
Bryconidae				
<i>Salminus brasiliensis</i> (Cuvier, 1816)	LME	X		
Anostomidae				
<i>Megaleporinus obtusidens</i> (Valenciennes, 1837)	LME	X		X
<i>Megaleporinus piavussu</i> (Britski, Birindelli e Garavello, 2012)	LME			X
<i>Leporinus paranensis</i> Garavello e Britski, 1987	NEW	X		X
<i>Leporinus octofasciatus</i> Steindachner, 1915	NEW	X		X
<i>Leporinus friderici</i> (Bloch, 1794)	NEW	X		X
<i>Schizodon nasutus</i> Kner, 1858	NEW			X
Characidae				
<i>Astyanax lacustris</i> (Lütken, 1975)	NEW	X		X
<i>Astyanax biotae</i> Castro e Vari, 2004	NEW			X
<i>Astyanax</i> <i>trierythropterus</i> Godoy, 1970	NEW	X		X
<i>Bryconamericus turiuba</i> (Langeani, Lucena, Pedrini & Tarelho-Pereira, 2005)	NEW			X
<i>Galeocharax gulo</i> (Steindachner, 1879)	NEW	X		
<i>Hyphessobrycon eques</i> (Steindachner, 1882)	NEW	X		X
<i>Serrapinnus kriegi</i> (Schindler, 1937)	NEW			X
<i>Piabina argentea</i> (Reinhardt, 1867)	NEW			X
<i>Piabarchus stramineus</i> (Eigenmann, 1908)	NEW	X		X
<i>Bryconamericus</i> spp.	NEW			X
<i>Odontostilbe</i> spp. Cope, 1870	NEW			X
Curimatidae				
<i>Steindachnerina insculpta</i> (Fernández-Yépez, 1948)	NEW			X
<i>Cyphocharax naegelii</i> (Steindachner, 1881)	NEW	X		X
Crenuchidae				
<i>Characidium zebra</i> Eigenmann, 1909	NEW	X		
Parodontidae				
<i>Apareiodon piracicabae</i> (Eigenmann, 1907)	NEW	X		
Prochilodontidae				
<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1836)	LME	X		X
Serrasalminidae				
<i>Serrasalmus maculatus</i> (Kner, 1858)	NEP			X
GYMNOTIFORMES				
Sternopygidae				
<i>Eigenmannia trilineata</i> (López e Castello, 1966)	NEW			X
PERCIFORMES				
Sciaenidae				
<i>Plagioscion squamosissimus</i> (Heckel, 1840) ¹	NEW	X		
SILURIFORMES				
Auchenipteridae				
<i>Tatia neivai</i> (Ihering, 1930)	NEW			X
Pimelodidae				
<i>Pimelodus fur</i> (Lütken, 1874)	NEW	X		X
<i>Pimelodus maculatus</i> (Lacépède, 1803)	LME	X		X
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Spix e Agassiz, 1829)	LME	X		
<i>Sorubim lima</i> (Bloch e Schneider, 1801) ¹	LME	X		X

<i>Iheringichthys labrosus</i> (Lütken, 1874)	NEW	X	X
<i>Pinirampus pinirampu</i> (Spix e Agassiz, 1829)	LME	X	
Heptapteridae			
<i>Pimelodella meeki</i> Eigenmann, 1910	NEW	X	X
<i>Phenacorhamdia tenebrosa</i> (Schubart, 1964)	NEW	X	X

* LME = Espécies migradoras de longa distância; NEW = Espécies não migrantes ou migradoras de curta distância; NEP = espécies não migrantes ou migradoras de curta distância com fertilização externa e cuidado parental. ¹ Espécie alóctone.

Densidade espaço-temporal, precipitação e vazão

Foram observadas maiores densidades de ovos nos pontos 3 e 5 (Figura 5 - A) e de larvas nos pontos 4 a 6 (figura 5 - B). Entretanto, a análise ANOVA Two-Way não apresentou valores significativos para estas diferenças.

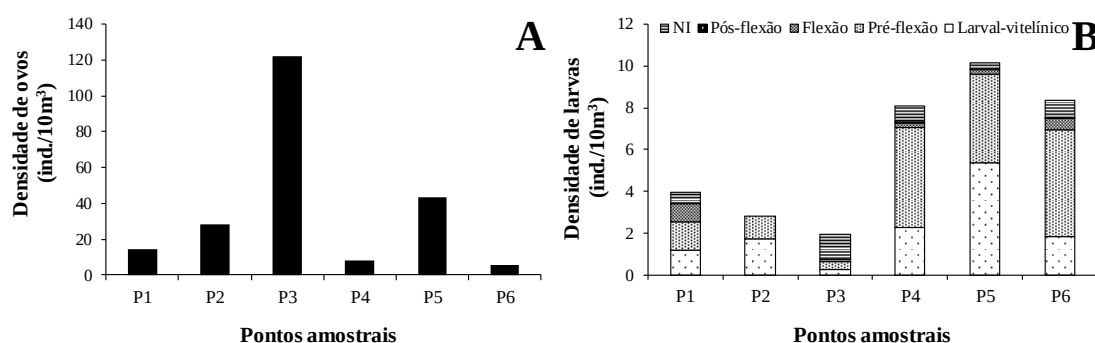


Figura 5. Densidade de ovos e larvas graficamente: (A) densidade de ovos e (B) densidade de larvas em diferentes estágios de desenvolvimento, nos diferentes pontos amostrais do rio Mogi-Guaçu, SP.

Na questão temporal, foram observadas maiores densidades de ovos e larvas nos meses de jan/19, jan/18 e fev/19 (Figura 6, A e B), sendo que o teste ANOVA Two-Way apresentou valores significativos, demonstrando ainda que apenas o mês de janeiro diferiu dos demais (Tabela S2; Tabela S4). Neste sentido, a análise de Correlação de Spearman, apontou no primeiro ciclo reprodutivo, correlação positiva entre densidade de ovos e precipitação, para todos os dias que antecederam a amostragem (5 até o dia da amostragem, e apenas um dia antes, quando correlacionado à vazão). Em relação ao segundo ciclo reprodutivo, houve correlação positiva entre densidade de ovos e precipitação para os dias 5, 4 e 3, e para os dias 3, 2 e 1, quando correlacionado

à vazão. Quanto à densidade de larvas, no primeiro ciclo, foi observado valor significativo apenas para 5 dias antes da amostragem, quando correlacionado a precipitação. Já no segundo ciclo reprodutivo, foi observada correlação positiva apenas entre densidade de larvas e vazão, para todos os dias (5 até o dia da amostragem) (Tabela S5).

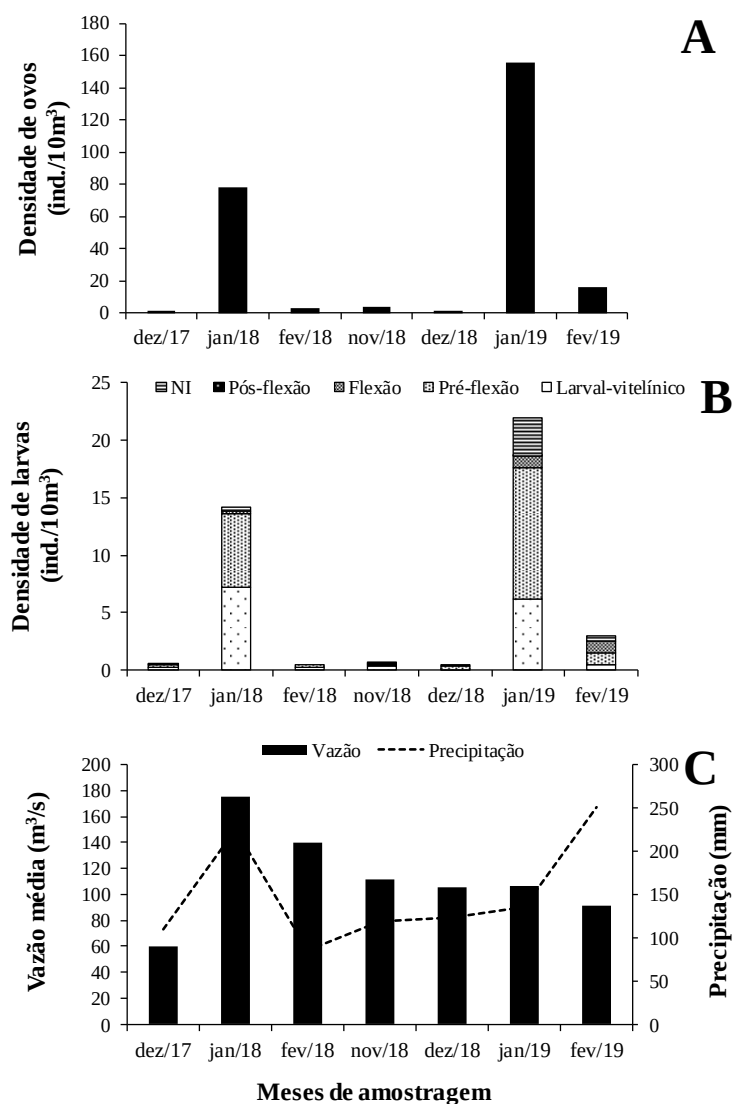


Figura 6. Densidade média de ovos (A) e larvas (B) e valores médios de precipitação e vazão (C) por mês de amostragem de amostragem de ictioplâncton do rio Mogi-Guaçu, SP.

O Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS), ilustrou que existem diferenças na estrutura das comunidades, tanto para ovos quanto para larvas. Para estes dois grupos, foram observadas diferenças entre os meses de janeiro e os demais meses amostrados, podendo-se admitir a formação de um agrupamento em azul, enquanto os outros pontos se encontram mais dispersos no gráfico (Figura 7, A e B). Os resultados da PERMANOVA, para ovos, demonstraram haver diferenças significativas entre pontos ($F=2.42$; $p=0.002$), meses ($F=3.84$; $p=0.001$) e na interação entre os fatores ($F=1.53$; $p=0.021$). Em relação às larvas, foram observadas diferenças significativas

entre pontos ($F=1.53$; $p=0.039$) e meses ($F=2.55$; $p=0.002$), mas não na interação entre os fatores (Tabela S6; Tabela S7).

O Teste Permanova pair-wise para ovos, comparando os pontos de coleta, mostrou diferenças significativas entre os pontos 2 e 4 ($p=0.004$), 2 e 6 ($p=0.001$), 2 e 5 ($p=0.001$), 3 e 4 ($p=0.023$) e 3 e 6 ($p=0.002$) (Tabela S8). Em relação aos ovos e os meses amostrados, o teste demonstrou haver diferenças significativas entre os meses de dezembro e janeiro ($p=0.001$); janeiro e fevereiro ($p=0.041$); janeiro e novembro ($p=0.004$); dezembro e fevereiro ($p=0.022$) (Tabela S10). Referente ao teste Permanova pair-wise para larvas, aplicado aos pontos de coleta, este demonstrou diferenças significativas entre os pontos 4 e 5 (0.017); 4 e 6 (0.045) (Tabela S9), e observadas diferenças significativas para larvas e meses, entre o mês de janeiro e os demais (Tabela S11).

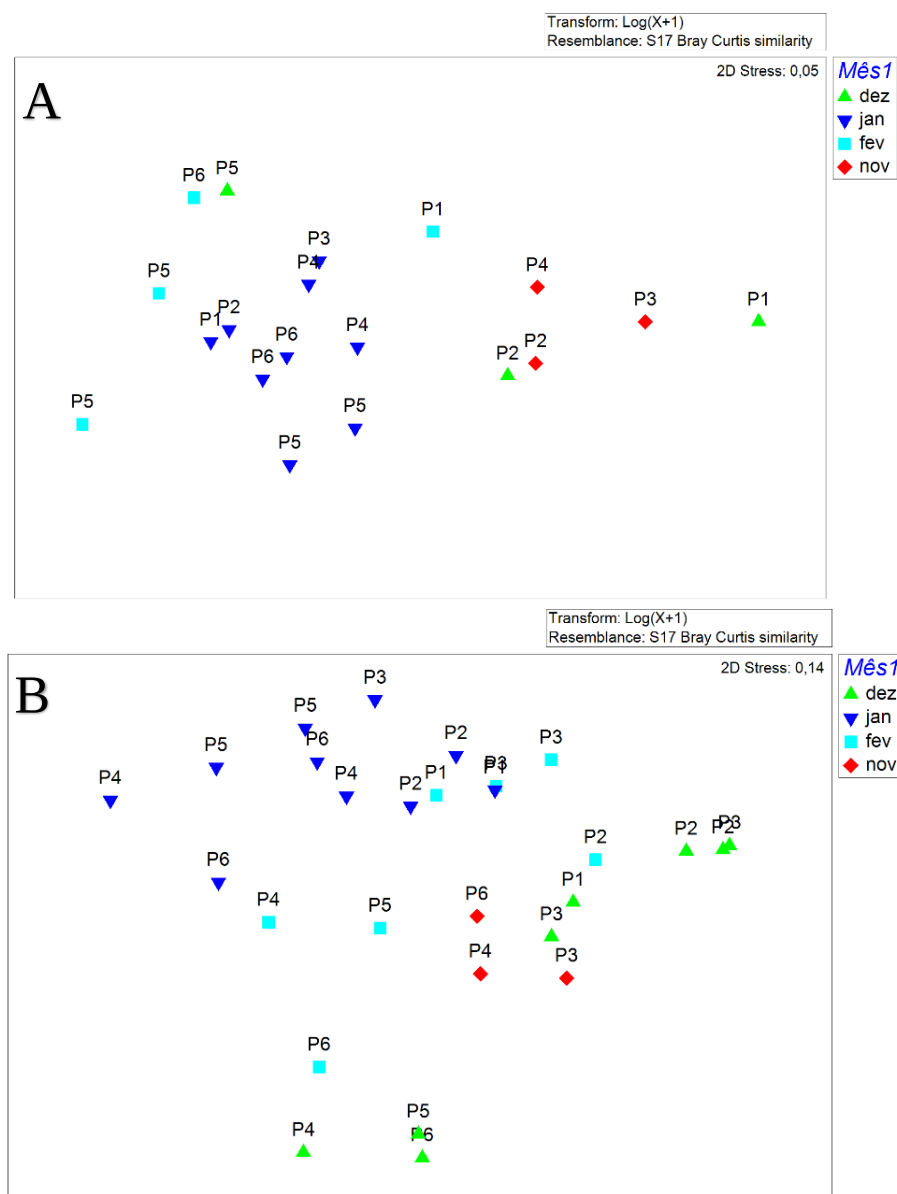


Figura 7. Ordenação pelo método de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) com base na

matriz de dissimilaridade de BrayCurtis, considerando a densidade espacial e temporal de (A) ovos e (B) larvas amostrados no rio Mogi-Guaçu.

A análise de porcentagem de similaridade (SIMPER) aplicada espacialmente para ovos, indicou altos valores de dissimilaridade média, entre a maioria dos pontos dos trechos superiores (1,2 e 3), composto apenas por espécies migradoras de longa distância, e inferiores (4, 5 e 6), majoritariamente composto por espécies migradoras de curta distância ou não migradoras (Tabela 12; Figura 8 A e B). Os pontos 3 e 6 foram os responsáveis pelo maior valor de dissimilaridade (93,07%), tendo *Pimelodus maculatus* (P3), *Pimelodus fur* (P6) e *Phenacorhamdia tenebrosa* (P6), como espécies mais contribuintes para essa diferença (Tabela 12). A similaridade média demonstrou que os pontos 1 e 2 foram os mais semelhantes, com contribuições de *Pimelodus maculatus* e *Pimelodus fur*, enquanto o ponto 3 apresentou maior número de espécies migradoras de longa distância, *Pimelodus maculatus*, *Pimelodus fur* e *Pseudoplatystoma corruscans* (Tabela S14). Já a análise aplicada temporalmente, demonstrou que os meses de dezembro e janeiro foram os que apresentaram maior dissimilaridade média (97,06%), com *Pimelodus maculatus* (jan), *Astyanax trierythropterus* (jan) e *Phenacorhamdia tenebrosa* (jan) como táxons mais contribuintes (Tabela S12).

Em relação a análise aplicada espacialmente para larvas, se observou maior valor de dissimilaridade média entre os pontos P3 e P6 (98,25%), sendo *Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Eigenmannia trilineata* e *Astyanax trierythropterus*, os táxons mais contribuintes. Analisando cada ponto separadamente, temos os pontos 1 e 2 com maior contribuição do táxon *Leporinus octofasciatus*, o ponto 3 com maior contribuição do táxon *Prochilodus lineatus*, o ponto 4 com maior contribuição do táxon *Leporinus paranensis* e os pontos 5 e 6 com maior contribuição do táxon *Astyanax trierythropterus*, acompanhada também de contribuição expressiva de *Pimelodus maculatus*. Analisado temporalmente, os meses de novembro e janeiro foram os que apresentaram maior dissimilaridade (99,70%), sendo *Astyanax trierythropterus*, *Leporinus paranensis* e *Leporinus octofasciatus*, as espécies mais contribuintes.

A distribuição de grandes migradores, entre os pontos de amostragens, demonstrou que a espécie *Pimelodus maculatus* se encontra presente em praticamente todos os pontos (com exceção de larvas para o ponto 4), com predominância de ovos no ponto 3 e larvas no ponto 6. As espécies *Pseudoplatystoma corruscans* (ovos), *Sorubim lima* (ovos) e *Prochilodus lineatus* (larvas), foram mais presentes no ponto 3, enquanto que *Salminus brasiliensis* (ovos) se mostrou mais presente no ponto 6. Considerando a riqueza, o ponto 6 apresentou mais espécies de migradores de longa distância para ovos e larvas, seguido pelo ponto 3, com a segunda maior riqueza de espécies registradas na fase de ovos (Figura 9, A e B).

Tabela 12. Análise de SIMPER para ovos das espécies com maior contribuição na similaridade entre os pontos de amostragens. Resultados da dissimilaridade (%) das quatro espécies de peixes que mais contribuíram em cada análise.

Espécies	Abundância média		Contrib. %	Espécies	Abundância média		Contrib. %	Espécies	Abundância média		Contrib. %
DM = 68,69	P1	P2		DM = 77,20	P2	P3		DM = 88,72	P3	P5	
Pmac	1,92	1,61	44,83	Pmac	1,61	1,62	40,7	Pmac	1,62	1,17	24,53
Pfur	1,94	0,98	37,54	Pfur	0,98	0,18	17,4	Pten	0	1,87	16,57
Atri	0,14	0,63	9,68	Pcor	0	0,63	10,28	Atri	0,3	1,5	13,47
				Atri	0,63	0,3	10,25	Pstr	0,01	0,3	10,31
DM = 76,92	P1	P3		DM = 89,38	P2	P4		DM = 93,07	P3	P6	
Pmac	1,92	1,62	38,69	Pfur	0,98	0,47	23,99	Pmac	1,62	0,44	22,3
Pfur	1,94	0,18	33,92	Atri	0,63	0,71	20,4	Pfur	0,18	0,38	11,11
Pcor	0	0,63	7,7	Pmac	1,61	0,58	18,91	Pten	0	0,62	8,95
Ilab	0	0,19	4,96	Plin	0,02	0,43	10,28	Pstr	0,01	0,22	8,73
DM = 85,19	P1	P4		DM = 92,18	P2	P5		DM = 86,40	P4	P5	
Pfur	1,94	0,47	31,93	Pmac	1,61	1,17	25,64	Atri	0,71	1,5	18,18
Pmac	1,92	0,58	29,11	Pten	0	1,87	15,93	Pten	0,18	1,87	17,91
Atri	0,14	0,71	12,07	Atri	0,63	1,5	14,73	Pmac	0,58	1,17	17,51
Plin	0	0,43	8	Pfur	0,98	0	13,49	Pmee	0,41	1,18	9,77
DM = 88,36	P1	P5		DM = 90,70	P2	P6		DM = 83,29	P4	P6	
Pfur	1,94	0	25,54	Pfur	0,98	0,38	19,37	Atri	0,71	0,47	15,75
Pmac	1,92	1,17	23,83	Pmac	1,61	0,44	18,34	Pfur	0,47	0,38	14,35
Pten	0	1,87	15,03	Atri	0,63	0,47	12,74	Pten	0,18	0,62	10,95
Atri	0,14	1,5	12,15	Pstr	0	0,22	11,04	Pmac	0,58	0,44	10,18
DM = 85,56	P1	P6		DM = 93,06	P3	P4		DM = 82,82	P5	P6	
Pfur	1,94	0,38	29,72	Pmac	1,62	0,58	23,88	Pten	1,87	0,62	20,34
Pmac	1,92	0,44	27,78	Atri	0,3	0,71	14,83	Pmac	1,17	0,44	16,66

Pten	0	0,62	8,2	Pfur	0,18	0,47	13,69	Atri	1,5	0,47	15,95
Atri	0,14	0,47	6,76	Plin	0	0,43	9,2	Pmee	1,18	0,3	9,74

Pmac= *Pimelodus maculatus*; Pfur= *Pimelodus fur*; Atri= *Astyanax trierythropterus*; Pcor= *Pseudoplatystoma corruscans*; Pten= *Phenacorhamdia tenebrosa*; Pstr= *Piabarchus stramineus*; Ilab= *Iheringichthys labrosus*; Plin= *Prochilodus lineatus*; Pmee= *Pimelodella meeki*. DM = Dissimilaridade média.

Tabela 13. Análise de SIMPER para larvas das espécies com maior contribuição na similaridade entre os pontos de amostragens. Resultados da dissimilaridade (%) das quatro espécies de peixes que mais contribuíram em cada análise.

Espécies	Abundância média		Contrib. %	Espécies	Abundância média		Contrib. %	Espécies	Abundância média		Contrib. %
DM = 91,69	P1	P2		DM = 93,49	P2	P3		DM = 98,09	P3	P5	
Loct	0,67	0,9	21,84	Plin	0	0,75	16,78	Atri	0	0,93	17,29
Pfur	0,46	0,09	17,95	Loct	0,9	0	15,66	Plin	0,75	0	14,81
Bsp.	0,07	0	13,04	Pfur	0,09	0	15,36	Lpar	0,47	0	9,24
Parg	0,46	0	9,55	Lpar	0,41	0,47	14,3	Pmac	0,02	0,14	8,57
DM = 94,35	P1	P3		DM = 85,18	P2	P4		DM = 98,25	P3	P6	
Plin	0	0,75	13,5	Lpar	0,41	1,38	23,52	Pmac	0,02	0,88	14,83
Loct	0,67	0	13,43	Loct	0,9	0,75	18,3	Plin	0,75	0	14,58
Parg	0,46	0	9,32	Cnae	0	0,86	11,49	Etri	0,04	0	10,89
Pfur	0,46	0	9,32	Pfur	0,09	0,46	7,81	Atri	0	0,97	10,81
DM = 91,45	P1	P4		DM = 98,21	P2	P5		DM = 97,64	P4	P5	
Lpar	0	1,38	18,18	Atri	0,02	0,93	17,4	Lpar	1,38	0	18,75
Loct	0,67	0,75	13,49	Loct	0,9	0	13,94	Atri	0,44	0,93	14,29
Pfur	0,46	0,46	10,77	Pmac	0,31	0,14	12,47	Cnae	0,86	0	9,62
Cnae	0	0,86	9,48	Pfur	0,09	0	10,89	Loct	0,75	0	9,37
DM = 94,82	P1	P5		DM = 85,80	P2	P6		DM = 90,78	P4	P6	
Atri	0	0,93	14,7	Pmac	0,31	0,88	20,47	Lpar	1,38	0,31	19,81
Loct	0,67	0	12,42	Pfur	0,09	0,03	17,81	Atri	0,44	0,97	11,55
Parg	0,46	0,06	11,83	Loct	0,9	0,13	16,52	Cnae	0,86	0,26	11,15
Pmac	0,29	0,14	9,6	Atri	0,02	0,97	12,45	Loct	0,75	0,13	9,63
DM = 96,37	P1	P6		DM = 86,33	P3	P4		DM = 91,55	P5	P6	
Pmac	0,29	0,88	14,69	Lpar	0,47	1,38	24,38	Atri	0,93	0,97	22,95
Bsp.	0,07	0	13,59	Plin	0,75	0,43	15,76	Pmac	0,14	0,88	19,33
Loct	0,67	0,13	12,6	Cnae	0	0,86	11,47	Parg	0,06	0	7,34
Pfur	0,46	0,03	11,51	Loct	0	0,75	11,22	Pstr	0,03	0	6,49

Pmac= *Pimelodus maculatus*; Pfur= *Pimelodus fur*; Atri= *Astyanax trierythropterus*; Pstr= *Piabarchus stramineus*; Plin= *Prochilodus lineatus*; Loct= *Leporinus octofasciatus*; Bsp.= *Bryconamericus spp.*; Parg= *Piabina argentea*; Lpar= *Leporinus paranensis*; Cnae= *Cyphocharax nagelii*; Etri= *Eingenmannia trilineata*. DM = Dissimilaridade média.

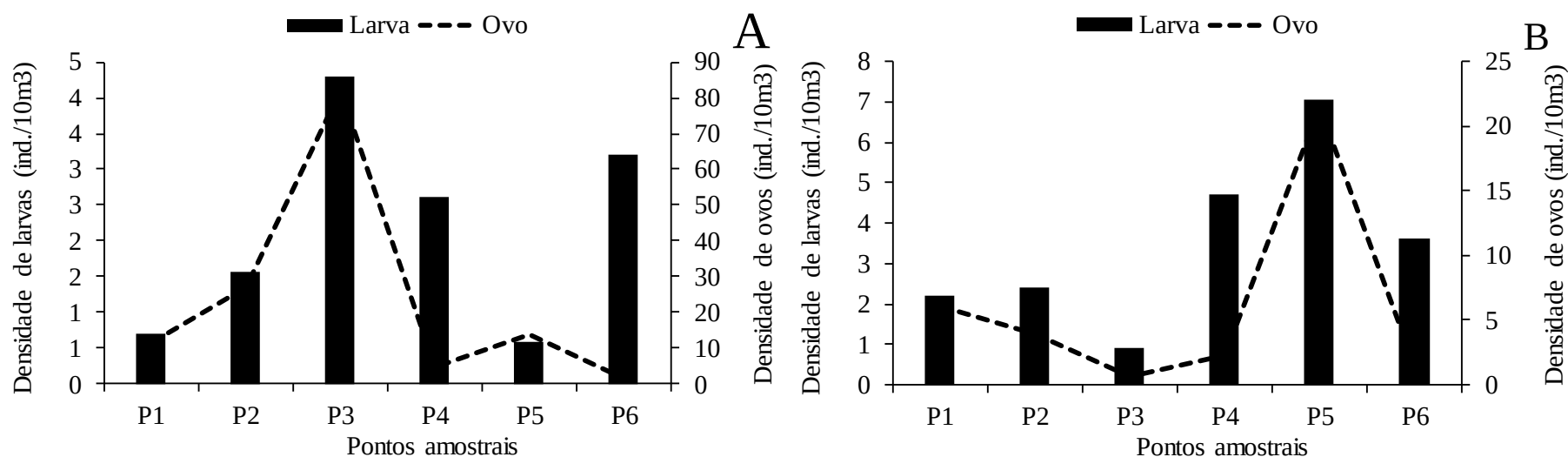


Figura 8. Densidade média de ovos e larvas por pontos amostral para (A) espécies migradoras de longa distância e (B) migradoras de curta distância ou não migradoras, capturadas no rio Mogi-Guaçu.

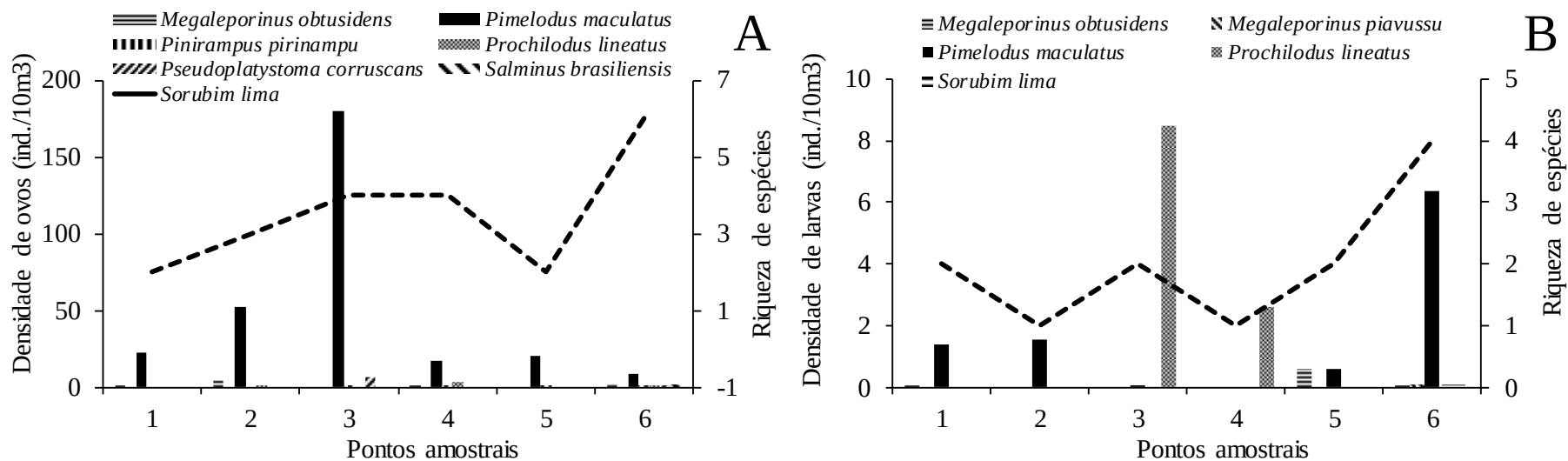


Figura 9. Densidade média por ponto amostral para (A) de ovos e (B) larvas de espécies migradoras de longa distância capturadas no rio Mogi-Guaçu.

Discussão

Dos 35 táxons registrados, foram identificadas quatro ordens e 13 famílias, sendo possível a identificação em nível de espécie de 33 deles, a maioria pertencente a grupos com fertilização externa e sem cuidado parental, sendo *Serrasalmus maculatus* o único táxon com cuidado parental identificado, registrado em estágio larval. Em relação às guildas reprodutivas, foram amostrados oito representantes migrantes de longas distâncias e 27 não-migrantes ou migrantes de curtas distâncias. A presença de um número significativo deste primeiro grupo, com destaque para espécies de alto valor econômico para pesca profissional, como *Pseudoplatystoma corruscans* (ovos), *Salminus brasiliensis* (ovos) e *Prochilodus lineatus* (ovos e larvas) (HOEINGHAUS e colab., 2009), apontam que as áreas em questão permitem a reprodução e desova destas, sugerindo que estes locais servem como mantenedores de seus ciclos reprodutivos. Espécies migradoras são conhecidas por realizarem grandes deslocamentos em direção a cabeceira do rio para desovar, e esses ovos e larvas derivam com a correnteza do rio encontrando locais propícios para seu desenvolvimento (AGOSTINHO e colab., 2003; BAUMGARTNER e colab., 2004; MAKRAKIS e colab., 2012; POMPEU e colab., 2012). Outro aspecto a ser considerado é que o rio Grande se encontra barrado logo acima da confluência com o rio Pardo. Estas populações de migradores, alternativamente, podem usar os rios Pardo e Mogi-Guaçu como rotas migratórias.

Confrontando as espécies identificadas e a lista com a revisão das espécies já descritas para bacia do rio Mogi-Guaçu (MESCHIATTI e ARCIFA, 2009), foram amostrados pouco mais de 21% dos táxons descritos. Este resultado pode ser explicado em partes, pelo tamanho reduzido da área amostral, bem como pela heterogeneidade de habitats amostrados e diferentes métodos de capturas, presentes na revisão. Considerando que nossas amostragens ocorreram apenas no canal principal do rio, e que o trabalho que confrontamos nossos dados considera amostragens em ambientes distintos, desde tributários de pequeno a grande porte, lagoas e canal principal do rio, já era esperado um número inferior de táxons presentes. Além disso, três espécies identificadas neste estudo (*Astyanax biotae*, *Pinirampus pirinampu* e *Sorubim lima*), não estavam presentes no levantamento realizado

por MESCHIATTI e ARCIFA (2009), sugerindo que a aplicação de ferramentas moleculares pode trazer maior resolutividade em levantamentos (GILLET e colab., 2018).

Os dados demonstraram maiores densidades de ovos nos trechos superiores, com destaque para o ponto P3, e de larvas nos trechos inferiores, com destaque para o ponto P5. Além disso, nos trechos inferiores foi possível a identificação de um grande número de larvas em estágio de flexão, caracterizado pela aquisição de estruturas responsáveis pelo nado, as quais permitem migrar para locais mais adequados para o crescimento e sobrevivência (DOWNIE e colab., 2020; NAKATANI e colab., 2001). Dessa forma, caracteriza-se o padrão de distribuição dos rios neotropicais, com a utilização de diferentes áreas para desova e crescimento, sendo que a desova ocorre nos trechos superiores, onde são encontradas áreas de corredeiras, e berçário de larvas nos trechos inferiores, onde observamos alagamentos laterais e a deriva destas para áreas propícias ao seu desenvolvimento (BAUMGARTNER e colab., 2004; BIALETZKI e colab., 2005; LOPES e colab., 2014; ROSA e SALVADOR, 2017).

Em relação ao período reprodutivo, foram observadas maiores densidades de ovos e larvas nos meses de janeiro nos dois ciclos reprodutivos. Analisando concomitantemente a vazão e a precipitação, observa-se que a chuva acumulada (até 5 dias antes da amostragem) influencia a vazão num período mais curto (<3 dias) que, por sua vez, influencia nos processos de desova e crescimento. A correlação positiva entre a densidade do ictioplâncton e a precipitação e vazão, indica que esses fatores são utilizados como gatilho ambiental para migração e desova, visto que as maiores densidades de ovos e larvas foram observadas em sincronia com os meses de maiores valores de precipitação e vazão. Esse resultado reforça a necessidade de manutenção de trechos livres de regulação, ou levemente barrados, visto que a operação de barragens pode mascarar os efeitos dos gatilhos ambientais (GOGOLA e colab., 2010).

Ainda com relação aos meses preferenciais para reprodução, diversos trabalhos demonstraram a importância do ciclo hidrológico na reprodução de peixes migratórios (AGOSTINHO e colab., 2004; CAROLSFELD e colab., 2003; LOZANO e colab., 2019; ROSA e SALVADOR, 2017; SANCHES e colab., 2020; VAZZOLER, 1996), onde a precipitação pode

promover alterações no fluxo, transparência, nível fluviométrico e condutividade elétrica, fatores intimamente relacionados à desova (BAUMGARTNER e colab., 2008; VAZZOLER, 1996).

A NMDS e a Permanova indicaram haver diferenças na estrutura de comunidades para ovos e larvas, tanto na questão temporal, quanto espacial. Estas diferenças se deram, principalmente, entre os trechos superiores (principalmente pontos 2 e 3) e inferiores (principalmente pontos 4 e 5) do rio para ovos, com um padrão de predomínio de espécies migradoras nos primeiros pontos, e migradoras de curta distância ou não migradoras nos últimos pontos. Espécies que realizam longas migrações possuem mais exigências para completar seu ciclo reprodutivo, necessitando de grandes trechos livres para encontrar locais favoráveis a desova e dispersão de sua prole, já que os locais de reprodução e alimentação são áreas distintas (GODINHO e colab., 2010; POMPEU e GODINHO, 2003). Isto demonstra que espécies não migrantes ou migrantes de curta distância podem ser consideradas mais “flexíveis”, e conseguem realizar a desova em ambientes variados do rio, já que não necessitam de ambientes separados para reprodução e alimentação (GODINHO e colab., 2010).

Em relação às larvas, tanto a NMDS quanto a Permanova, indicaram diferenças na estrutura das comunidades, espacialmente, entre os pontos 4 e 5, e entre os pontos 4 e 6, enquanto que temporalmente, demonstrou diferenças entre o mês de janeiro e os demais. Analisando os pontos em questão, a distribuição dos migradores de longa distância se apresentou de forma mais homogênea, sendo possível encontrar larvas deste grupo em todos os pontos, sendo que a maior abundância foi observada nos pontos inferiores, principalmente no ponto 6, com maior representação da espécie *Pimelodus maculatus*. Uma possível explicação para não termos encontrado um padrão bem delimitado, com uma grande predominância de larvas de migradores de longa distância nos trechos inferiores, seria a possibilidade da desova estar ocorrendo logo nos primeiros pontos ou estarem se desenvolvendo antes do ponto 4, e também ao fato de que os outros grupos, não necessitam de locais bem delimitados para desova. Além disso, a grande quantidade de larvas em estágios mais avançados de desenvolvimento, pode ter levado a um número inferior de captura, levando em consideração que estas já possuem estruturas que possibilitam o nado, e consequentemente, condições de “evitar” as redes de captura (GRIOCHE e colab., 2000).

Em relação à distribuição temporal, é possível notar claramente maior abundância de larvas no mês de janeiro, seguida do mês de fevereiro. Analisando os grupos amostrados, observa-se captura de grandes migradores em todos os meses, porém em abundância muito baixa quando comparado com o mês de janeiro, o qual teve a presença de espécies de todas as guildas reprodutivas. Observando as precipitações médias anuais, é possível constatar que os dois maiores picos de chuva ocorreram nos meses de janeiro de 2018 e fevereiro de 2019. Isso reforça a precipitação como gatilho ambiental para desova de espécies migradoras de longa distância (AGOSTINHO e colab., 2004), as quais possuem período reprodutivo mais curto. A presença da espécie *Pimelodus maculatus* em todos os meses de amostragens, corrobora a literatura, demonstrando que a espécie em questão, se reproduz em todos os meses que englobam o período reprodutivo relacionado as precipitações (GONÇALVES e BRAGA, 2008; PASCHOALINI e colab., 2013).

A presença de *Pimelodus maculatus*, nos estágios de ovos e larvas, nos pontos acima e abaixo da PCH de Emas, como demonstrado pelo Simper, sugere que esta não representa um impedimento físico para a reprodução, permitindo tanto a desova quanto a deriva das larvas. Outros estudos já demonstraram a viabilidade da desova e desenvolvimento do ictioplâncton, apesar da presença de empreendimentos desfavoráveis a reprodução (LOPES e ZANIBONI-FILHO, 2019), destacando a importância de tributários na manutenção da abundância e diversidade de espécies, reduzindo os impactos das barragens sobre a ictiofauna (MARQUES e colab., 2018). Entretanto, essa hipótese não pode ser corroborada, visto que podem haver adultos residentes em trechos acima da PCH, e a ausência de outras espécies de grandes migradores, principalmente no ponto acima da barragem, pode sugerir que esta esteja constituindo uma barrreira, ou ainda, que os pontos abaixo da PCH apresentem áreas propícias à reprodução.

Conclusão

Este estudo demonstrou que o trecho do rio Mogi-Guaçu estudado, apresenta padrão de distribuição condizente com rios neotropicais, com predominância de ovos nos trechos superiores e

larvas nos trechos inferiores (BAUMGARTNER e colab., 2004; BIALETZKI e colab., 2005; LOPES e colab., 2014; ROSA e SALVADOR, 2017). Também foi possível observar, a estruturação da comunidade local, constatando uma predisposição de desova em local de corredeira, para espécies migradoras de longa distância, e preferência de desova em áreas de várzea, para espécies migradoras de curta distância ou não migradoras. A identificação total do ictioplâncton coletado, permitiu uma melhor acurácia, possibilitando encontrar espécies ausentes em um estudo de revisão anterior da bacia (MESCHIATTI e ARCIFA, 2009). Além disso, foi possível identificar espécies com grande valor comercial, sugerindo que a área de estudo apresenta locais propícios para a manutenção de suas populações. Sabendo dos possíveis impactos de barragens sobre as assembleias de peixes, foi analisado se a presença de uma pequena central hidrelétrica na área de estudo, estaria afetando a comunidade local. O período e amplitude destas alterações podem depender de muitos fatores, como morfologia da bacia hidrográfica, particularidades da ictiofauna presente e a estrutura das barragens existentes (ARANTES e colab., 2019). Os dados observados sugerem não estar ocorrendo fragmentação entre as áreas de montante e jusante da barragem, onde foram encontrados ovos e larvas de espécie da família Pimelodidae. Essas observações, reforçam a importância do rio como ambiente adequado para reprodução de muitas espécies, apresentando alta atividade de grandes migradores.

Assim como visto na literatura, foi comprovado que os fatores precipitação e vazão, estão ligados a gatilhos ambientais para reprodução de peixes (CAROLSFELD e colab., 2003; LOZANO e colab., 2019), reforçando a autenticidade do período reprodutivo conhecido como “piracema”, ocorrendo desova entre o período de novembro a fevereiro, concomitantemente com a estação chuvosa (AMAZON e colab., 2017; BARZOTTO e MATEUS, 2017; OLIVEIRA e colab., 2010). Contudo, para uma validação dessa afirmação, seria necessário a expansão do período amostral para contemplar meses fora desse intervalo. Assim sendo, permanecem questões sobre a proteção de espécies fora do período de defeso, caracterizado por eventos reprodutivos atípicos, principalmente em anos em que o ciclo de chuvas seja alterado em função de fenômenos climáticos. Além de um melhor aprofundamento sobre a reprodução de grandes migradores locais, visto que apenas ovos e larvas de uma única espécie da família Pimelodidae foi capturada acima da barragem.

Por fim, concluímos que as técnicas empregadas neste estudo possibilitaram gerar dados valiosos para a bacia do rio Mogi Guaçu, relacionados a áreas preferenciais, identificação e caracterização da estrutura das comunidades locais, podendo ser empregados em estudos que visem estabelecer estratégias para elaboração e implementação de planos de ação e manejo.

Referências bibliográficas

- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I. AND JÚLIO JR., H.F. **Migratory fish of upper Paraná River basin, Brazil**. Vitoria: [s.n.], 2003.
- AGOSTINHO, Angelo A. e colab. **Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: Effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment**. Reviews in Fish Biology and Fisheries, v. 14, n. 1, p. 11–19, 2004.
- AMAZON, Lower e colab. **Variação espacial e temporal de larvas de Anostomidae (Pisces , Characiformes) na região do Baixo Amazonas , Pará , Brasil Spatial and temporal variation of Anostomid larvae (Pisces , Characiformes) in the region of**. v. 5, p. 91–100, 2017.
- ANDERSON, Elizabeth P. e colab. **Fragmentation of Andes-to-Amazon connectivity by hydropower dams**. Science Advances, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2018.
- ANDERSON, Marti e GORLEY, Ray N e CLARKE, K Robert. **PERMANOVA + for PRIMER user manual**. . Plymouth: PRIMER-E, 2008.
- ARANTES, Caroline C. e colab. **Impacts of hydroelectric dams on fishes and fisheries in tropical rivers through the lens of functional traits**. Current Opinion in Environmental Sustainability, v. 37, p. 28–40, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cosust.2019.04.009>>.
- ARAÚJO, Ercilia S. e colab. **Changes in distance decay relationships after river regulation: Similarity among fish assemblages in a large Amazonian river**. Ecology of Freshwater Fish, v. 22, n. 4, p. 543–552, 2013.
- ATHAYDE, Simone e colab. **Mapping research on hydropower and sustainability in the Brazilian Amazon: advances, gaps in knowledge and future directions**. Current Opinion in Environmental Sustainability, v. 37, p. 50–69, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cosust.2019.06.004>>.
- BANK, WORLD. **World development report 2016: digital dividends overview**. . Washington: [s.n.], 2016.
- BARTHEM, Ronaldo Borges e DE BRITO RIBEIRO, Mauro César Lambert e PETRERE JR, Miguel. **Life strategies of some long-distance migratory catfish in relation to hydroelectric dams in the Amazon Basin**. Biological Conservation, v. 55, n. 3, p. 339–345, 1991.
- BARZOTTO, E. e MATEUS, L. **Reproductive biology of the migratory freshwater fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) in the Cuiabá River basin, Brazil**. Journal of Applied Ichthyology, v. 33, n. 3, p. 415–422, 2017.

- BAUMGARTNER, Gilmar e colab. **Fish larvae from the upper Paraná River : Do abiotic factors affect larval density ?** v. 6, n. 4, p. 551–558, 2008.
- BAUMGARTNER, Gilmar e colab. **Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River, Brazil.** Environmental Biology of Fishes, v. 71, n. 2, p. 115–125, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10641-004-0098-z>>.
- BAUMGARTNER, Lee J. e colab. **Comparing fishway designs for application in a large tropical river system.** Ecological Engineering, v. 120, n. May, p. 36–43, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.05.027>>.
- BECKER, R. A. e colab. **DNA barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the Upper Paraná and São Francisco.** Journal of Fish Biology, v. 87, n. 1, p. 159–168, 2015.
- BIALETZKI, Andréa e colab. **Larval fish assemblage in the Baía River (Mato Grosso do Sul State, Brazil): Temporal and spatial patterns.** Environmental Biology of Fishes, v. 73, n. 1, p. 37–47, 2005.
- BIG-ANEEL. (BIG), **Banco de Informações de Geração.**
- BURCHSTED, Denise e DANIELS, Melinda D. **Classification of the alterations of beaver dams to headwater streams in northeastern Connecticut, U.S.A.** Geomorphology, v. 205, p. 36–50, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.geomorph.2012.12.029>>.
- CAROLSFELD, J. e colab. **Migratory Fishes of South America.** [S.l.: s.n.], 2003. Disponível em: <<http://elibrary.worldbank.org/doi/book/10.1596/1-5525-0114-0>>.
- CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **PRIMER v6: User manual/tutorial.** Plymouth: PRIMER-E, 2006.
- COLLEN, Ben e colab. **Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism.** Global Ecology and Biogeography, v. 23, n. 1, p. 40–51, 2014.
- COUTO, Thiago B.A. e OLDEN, Julian D. **Global proliferation of small hydropower plants – science and policy.** Frontiers in Ecology and the Environment, v. 16, n. 2, p. 91–100, 2018.
- DA GRAÇA, W. J., & PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes.** Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2007.
- DA SILVA, Patricia Sarai e colab. **Tributaries as biodiversity preserves: An ichthyoplankton perspective from the severely impounded Upper Paraná River.** Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, v. 29, n. 2, p. 258–269, 2019.
- DAMS, ICOLD- International Commission on Large. **No Title.** Disponível em: <http://www.icold-cigb.net/article/GB/world_register/general_synthesis/number-of-dams-by-country-members>.

- DE LIMA, Fabíula T. e REYNALTE-TATAJE, David A. e ZANIBONI-FILHO, Evoy. **Effects of reservoirs water level variations on fish recruitment**. Neotropical Ichthyology, v. 15, n. 3, p. 1–10, 2017.
- DOWNIE, Adam T. e colab. **Swimming performance of marine fish larvae: review of a universal trait under ecological and environmental pressure**. Reviews in Fish Biology and Fisheries, v. 30, n. 1, p. 93–108, 2020.
- DUDGEON, David. Threats to Freshwater Biodiversity in a Changing World. Global environmental change. [S.l.]: Springer Netherlands, 2014. p. 243–253.
- EDGAR, Robert C. **Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST**. Bioinformatics, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.
- ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J. & ELER, M. N. **Avaliação das modificações na qualidade da água do Rio Mogi-Guaçu: uma análise temporal**. São Carlos: [s.n.], 2003.
- FAO, ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT ; OECD, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -. **OECD-FAO Agricultural**. . Paris: [s.n.], 2015.
- FORSBERG, Bruce R. e colab. **The potential impact of new Andean dams on Amazon fluvial ecosystems**. [S.l: s.n.], 2017. v. 12.
- FRANTINE-SILVA, W. e colab. **DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring**. Molecular Ecology Resources, v. 15, n. 5, p. 1226–1237, 2015.
- GARCIA, Diego Azevedo Zoccal e colab. **Spatial distribution and habitat use by early fish stages in a Dammed river Basin, Southern Brazil**. Revista de Biologia Tropical, v. 66, n. 2, p. 605–621, 2018.
- GHANBARI, Mahdi e KNEIFEL, Wolfgang e DOMIG, Konrad J. **A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing**. Aquaculture, v. 448, p. 464–475, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>>.
- GILLET, Benjamin e colab. **Direct fishing and eDNA metabarcoding for biomonitoring during a 3-year survey significantly improves number of fish detected around a South East Asian reservoir**. PLoS ONE, v. 13, n. 12, p. 1–25, 2018.
- GODINHO, Alexandre Lima e LAMAS, Ivana Reis e GODINHO, Hugo Pereira. **Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes**. Environmental Biology of Fishes, v. 87, n. 2, p. 143–162, 2010.
- GODOY, M. P. **Locais de desova de peixes em um trecho do Mogi Guassu, SP**. Rev. Brasil. Biol.,

v. 14, p. 375–396, 1954.

GOGOLA, Tatiane M. e colab. **Spatial and temporal distribution patterns of ichthyoplankton in a region affected by water regulation by dams.** Neotropical Ichthyology, v. 8, n. 2, p. 341–349, 2010.

GONÇALVES, C S e BRAGA, F M S. **Diversidade e ocorrência de peixes na área de influência da UHE Mogi Guaçu e lagoas marginais, bacia do alto rio Paraná, São Paulo, Brasil.** Biota Neotropica, v. 8, n. 2, p. 103–114, 2008.

GREEN, M.R. e SAMBROOK, J. **Manual, Molecular Cloning: A Laboratory.** 4. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GRIOCHE, A. e colab. **Vertical migrations of fish larvae: Eulerian and Lagrangian observations in the Eastern English Channel.** Journal of Plankton Research, v. 22, n. 10, p. 1813–1828, 2000.

HEBERT, Paul D N e colab. **Biological identifications through DNA barcodes.** n. September 2002, p. 313–321, 2003.

HOEINGHAUS, David J e colab. **Effects of River Impoundment on Ecosystem Services of Large Tropical Rivers : Embodied Energy and Market Value of Artisanal Fisheries.** v. 23, n. 5, p. 1222–1231, 2009.

IVANOVA, NATALIA; GRAINGER, Christopher M. **CCDB.** n. May 2007, 2014.

IWASAKI, Yuichi e colab. **Evaluating the relationship between basin-scale fish species richness and ecologically relevant flow characteristics in rivers worldwide.** Freshwater Biology, v. 57, n. 10, p. 2173–2180, 2012.

JENNINGS, W. Bryan e colab. **Barcoding the Neotropical freshwater fish fauna using a new pair of universal COI primers with a discussion of primer dimers and M13 primer tails.** Genome, v. 62, n. 2, p. 77–83, 2019.

JUNK, W J e BAYLEY, Peter B. e SPARKS, Richard E. **The flood pulse concept in river-floodplain systems.** Canadian special publication of fisheries and aquatic sciences, v. 106, n. 1, p. 110–127, 1989.

KO, Hui Ling e colab. **Evaluating the Accuracy of Morphological Identification of Larval Fishes by Applying DNA Barcoding.** PLoS ONE, v. 8, n. 1, p. 3–9, 2013.

LANGEANI, Francisco. **Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná : composição atual e perspectivas futuras.** Biota Neotropica, v. 7, n. 3, p. 181–197, 2007. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v7n3/pt/abstract?article+bn03407032007>>.

LEWIS, Leah A. e colab. **Integrating DNA barcoding of fish eggs into ichthyoplankton**

- monitoring programs.** Fishery Bulletin, v. 114, n. 2, p. 153–165, 2016.
- LIRA, Nibelle A. e colab. **Fish passages in South America: An overview of studied facilities and research effort.** Neotropical Ichthyology, v. 15, n. 2, p. 1–14, 2017.
- LOBATO, T. C. e colab. **Construction of a novel water quality index and quality indicator for reservoir water quality evaluation: A case study in the Amazon region.** Journal of Hydrology, v. 522, p. 674–683, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.01.021>>.
- LOPES, Carolina Antonieta e GARCIA, Valquíria e REYNALTE-TATAJE, David Augusto. **Acta Scientiarum Temporal distribution of ichthyoplankton in the Forquilha river , upper Uruguay river – Brazil : Relationship with environmental factors.** v. 17993, p. 59–65, 2014.
- LOPES, Carolina Antonieta e ZANIBONI-FILHO, Evoy. **Mosaic environments shape the distribution of Neotropical freshwater ichthyoplankton.** Ecology of Freshwater Fish, v. 28, n. 4, p. 544–553, 2019.
- LOZANO, Ismael E. e colab. **Episodic recruitment of young Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) during high discharge in a floodplain lake of the River Paraná, Argentina.** Fisheries Management and Ecology, v. 26, n. 3, p. 260–268, 2019.
- MAKRAKIS, M C e colab. **Diversity in migratory patterns among Neotropical fishes.** p. 866–881, 2012.
- MARQUES, Hugo e colab. **Importance of dam-free tributaries for conserving fish biodiversity in Neotropical reservoirs.** Biological Conservation, v. 224, n. June, p. 347–354, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.05.027>>.
- MARTIN, Marcel. **Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.**
- MESCHIATTI, AJ. AND ARCIFA, MS. **A review on the fishfauna of Mogi-Guaçu River basin : a century of studies.** v. 21, n. 1, p. 135–159, 2009.
- MMA, Ministério do Meio Ambiente. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de extinção.** Brasília: [s.n.], 2018. v. I.
- NAKATANI, K., AGOSTINHO, A. A., BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SANCHES, P. V., MAKRAKIS, M. C. & PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação.** Maringá: [s.n.], 2001.
- NILSSON, Christer e colab. **Fragmentation and flow regulation of the world's large river systems.** Science, v. 308, n. 5720, p. 405–408, 2005.
- NOBILE, André Batista e colab. **Damming and seasonality as modulators of fish community**

- structure in a small tributary.** Ecology of Freshwater Fish, v. 28, n. 4, p. 563–572, 2019.
- NOVÁK, Petr e NEUMANN, Pavel e MACAS, Jiří. **Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data.** p. 1–12, 2010.
- OLDANI, Norberto Oscar e colab. **Is fish passage technology saving fish resources in the lower La Plata River basin?** Neotropical Ichthyology, v. 5, n. 2, p. 89–102, 2007.
- OLIVEIRA, Edson Fontes e colab. **Ecomorphological patterns of the fish assemblage in a tropical floodplain: Effects of trophic, spatial and phylogenetic structures.** Neotropical Ichthyology, v. 8, n. 3, p. 569–586, 2010.
- OTA, Renata Rúbia e colab. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: Revised, annotated and updated.** Neotropical Ichthyology, v. 16, n. 2, p. 1–111, 2018.
- PASCHOALINI, Alessandro Loureiro e colab. **Reproduction of pimelodus maculatus (Siluriformes: Pimelodidae) in three section of Grande river basin, Downstream Porto Colombia Dam, South-Eastern Brazil.** Neotropical Ichthyology, v. 11, n. 3, p. 615–623, 2013.
- POMPEU, P. S. e AGOSTINHO, A. A. e PELICICE, F. M. **Existing and future challenges: the concept of successful fish passage in South America.** River Research and Applications, v. 28, n. 4, p. 504–512, Maio 2012.
- POMPEU, P.S. e GODINHO, H.P. **Ictiofauna de três lagoas marginais do médio São Francisco.** [S.l: s.n.], 2003.
- REIS, R. E. e colab. **Fish biodiversity and conservation in South America.** p. 12–47, 2016.
- REYNALTE-TATAJE, David A. e colab. **Temporal variability of fish larvae assemblages: Influence of natural and anthropogenic disturbances.** Neotropical Ichthyology, v. 10, n. 4, p. 837–846, 2012.
- REYNALTE-TATAJE, David Augusto e colab. **Temporal distribution of ichthyoplankton in the Ivinhema River (Mato Grosso do Sul State / Brazil): Influence of environmental variables.** v. 9, n. 2, p. 427–436, 2011.
- ROSA, G R e SALVADOR, G N. **Spatial and temporal distribution of ichthyoplankton during an unusual period of low flow in a tributary of the São Francisco River , Brazil.** n. September, p. 1–14, 2017.
- SANCHES, Paulo Vanderlei e colab. **Arms as areas for larval development of migratory fish species in a Neotropical reservoir and the influence of rainfall over abundances.** Journal of Fish Biology, v. 97, n. 5, p. 1306–1316, 2020.
- SANCHES, Paulo Vanderlei e colab. **Flow regulation by Dams affecting ichthyoplankton: The**

- case of the Porto Primavera Dam, Paraná River, Brazil.** River Research and Applications, v. 22, n. 5, p. 555–565, 2006.
- SYSTEM, AQUASTAT- FAO's Global Water Information. **No Title.** Disponível em: <<http://www.fao.org/nr/water/aquastat/dams/index.stm>>.
- TABERLET, Pierre e COISSAC, Eric. **Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding.** v. 33, p. 2045–2050, 2012.
- TANAKA, S. **Stock assessment by means of ichthyoplankton surveys.** FAO Fisheries Technical Paper, v. 122, p. 33–51, 1973.
- VAN DIJK, Erwin L. e colab. **The Third Revolution in Sequencing Technology.** Trends in Genetics, v. 34, n. 9, p. 666–681, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>>.
- VASCONCELOS, L. P. e ALVES, D. C. e GOMES, L. C. **Fish reproductive guilds downstream of dams.** Journal of Fish Biology, v. 85, n. 5, p. 1489–1506, 2014.
- VAZZOLER, E. A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1996.
- WANG, Jinliang e RYMAN, Nils. **Genetic effects of multiple generations of supportive breeding.** Conservation Biology, v. 15, n. 6, p. 1619–1631, 2001.
- WARD, R. D. e colab. **DNA barcoding Australia's fish species.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 360, n. 1462, p. 1847–1857, Out 2005.
- WICKER, Thomas e colab. **A unified classification system for eukaryotic transposable elements.** Nature reviews, v. 8, n. december, p. 973–982, 2007.
- ZAHAR, Yadh e GHORBEL, Abdelmajid e ALBERGEL, Jean. **Impacts of large dams on downstream flow conditions of rivers: Aggradation and reduction of the Medjerda channel capacity downstream of the Sidi Salem dam (Tunisia).** Journal of Hydrology, v. 351, n. 3–4, p. 318–330, 2008.
- ZARFL, Christiane e colab. **A global boom in hydropower dam construction.** Aquatic Sciences, v. 77, n. 1, p. 161–170, Jan 2015.
- ZHANG, Jiajie e colab. **Genome analysis PEAR : a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR.** Oxford University Press, v. 30, n. 5, p. 614–620, 2014.

Material Suplementar

Tabela S1. Análise de variância (ANOVA Two-way) da densidade de larvas em relação aos pontos e em relação aos meses de amostragens (em negrito valor significativo = $p < 0,05$).

Variação dos fatores	DF	SS	MS	F	P
Ponto	5	0,541	0,108	0,666	0,654
Data	3	6,611	2,204	13,566	<0,001
Ponto x Data	15	2,493	0,166	1,023	0,476
Residual	18	2,924	0,162		
Total	41	12,821	0,313		

Tabela S2. Análise de variância (ANOVA Two-way) da densidade de larvas em relação a comparação entre os meses de amostragens (em negrito valor significativo = $p < 0,05$).

Comparação	Diferença entre as médias	p	q	P	P<0,050
jan vs. dez	0,908	4	7,800	<0,001	Yes
jan vs. fev	0,858	4	7,377	<0,001	Yes
jan vs. nov	0,853	4	5,988	0,003	Yes
nov vs. dez	0,0542	4	0,380	0,993	No
nov vs. fev	0,00500	4	0,0351	1,000	Não testado
fev vs. dez	0,0492	4	0,423	0,990	Não testado

Tabela S3. Análise de variância (ANOVA Two-way) da densidade de ovos em relação aos pontos e em relação aos meses de amostragens (em negrito valor significativo = $p < 0,05$).

Variação dos fatores	DF	SS	MS	F	P
Ponto	5	1,145	0,229	0,923	0,489
Data	3	10,663	3,554	14,316	<0,001
Ponto x Data	15	6,030	0,402	1,619	0,164
Residual	18	4,469	0,248		
Total	41	22,594	0,551		

Tabela S4. Análise de variância (ANOVA Two-way) da densidade de ovos em relação a comparação entre os meses de amostragens (em negrito valor significativo = $p < 0,05$).

Comparação	Diferença entre as médias	p	q	P	P<0,050
jan vs. dez	1,226	4	8,522	<0,001	Yes
jan vs. fev	1,017	4	7,068	<0,001	Yes
jan vs. nov	1,006	4	5,709	0,004	Yes
nov vs. dez	0,220	4	1,249	0,814	No
nov vs. fev	0,0108	4	0,0615	1,000	Não testado
fev vs. dez	0,209	4	1,454	0,736	Não testado

Tabela S5. Teste de correlação de SPEARMAN para as densidades de ovos e larvas correlacionadas com os fatores vazão e precipitação, dos 5 dias antes das amostragens até o dia da

amostragem (em negrito valor significativo = $p < 0,05$).

			5 dias	4 dias	3 dias	2 dias	1 dia	No dia
Larvas x vazão	Ciclo 1	Coeficiente de correlação	-0,0219	-0,0219	0,0252	0,0724	0,0768	0,283
		p valor	0,928	0,928	0,915	0,767	0,754	0,248
	Ciclo 2	Coeficiente de correlação	0,49	0,476	0,452	0,493	0,536	0,579
		p valor	0,0151	0,0189	0,0266	0,0145	0,00705	0,00313
Ovos x vazão	Ciclo 1	Coeficiente de correlação	0,124	0,124	0,194	0,264	0,409	0,586
		p valor	0,615	0,615	0,436	0,285	0,089	0,0103
	Ciclo 2	Coeficiente de correlação	0,407	0,383	0,385	0,459	0,459	0,505
		p valor	0,0486	0,0643	0,063	0,0241	0,0241	0,012
Larvas x precipitação	Ciclo 1	Coeficiente de correlação	0,518	0,518	0,361	0,361	0,322	0,162
		p valor	0,0269	0,0269	0,136	0,136	0,186	0,514
	Ciclo 2	Coeficiente de correlação	0,524	0,496	0,549	0,483	-0,26	-0,32
		p valor	0,00872	0,0138	0,00557	0,0171	0,217	0,126
Ovos x precipitação	Ciclo 1	Coeficiente de correlação	0,628	0,628	0,86	0,86	0,94	1
		p valor	0,00515	0,00515	0,0000002	0,0000002	0,0000002	0,0000002
	Ciclo 2	Coeficiente de correlação	0,473	0,451	0,415	0,472	-0,168	-0,216
		p valor	0,0197	0,0269	0,0431	0,0202	0,429	0,306

Tabela S6. Dados da PERMANOVA comparando a influência dos pontos e meses na distribuição da comunidade de ovos.

Fatores	df	SS	MS	Pseudo-F	P(Perm)	Unique perms	P(MC)
Ponto	5	25274	5054,7	2,4232	0,002	998	0,002
Mês	3	24049	8016,3	3,843	0,001	998	0,001
Ponto x Mês	12	38437	3203,1	1,5356	0,021	997	0,044
Resultado	7	14602	2085,9				
Total	27						

Tabela S7. Dados da PERMANOVA comparando a influência dos pontos e meses na distribuição da comunidade de larvas.

Fatores	df	SS	MS	Pseudo-F	P(Perm)	Unique perms	P(MC)
Ponto	5	20553	4110,7	1,5336	0,039	996	0,1
Mês	3	20572	6857,3	2,5582	0,002	998	0,004
Ponto x Mês	6	23604	3934	1,4677	0,056	996	0,107
Resultado	5	10722	2680,5				
Total	18						

Tabela S8. Teste Permanova pairwise elaborado com os dados do número de exemplares de ovos e os pontos de amostragens.

Pontos	T	P(Perm)	Unique	
			perms	P(MC)
P2, P3	1,5134	0,075	994	0,108
P2, P4	1,9598	0,004	995	0,028
P2, P6	2,8635	0,001	993	0,006
P2, P5	3,0363	0,001	961	0,004
P2, P1	2,0845	0,057	591	0,054
P3, P4	1,3618	0,023	998	0,142
P3, P6	1,7	0,002	996	0,034
P3, P5	1,3549	0,065	996	0,145
P3, P1	1,175	0,228	931	0,322
P4, P6	0,63067	0,925	952	0,843
P4, P5	0,96986	0,554	956	0,468
P4, P1	1,1789	0,292	743	0,379
P6, P5	1,0167	0,397	957	0,445
P6, P1	1,8572	0,077	745	0,12
P5, P1	2,0317	0,039	210	0,092

Tabela S9. Teste Permanova pairwise elaborado com os dados do número de exemplares de larvas e os pontos de amostragens.

Pontos	T	P(Perm)	Unique	
			perms	P(MC)
P4, P5	1,3441	0,017	98	0,157
P4, P6	1,4363	0,045	45	0,191
P4, P2	0,98475	0,483	167	0,505
P4, P3	0,99509	0,381	30	0,495
P4, P1	1,0576	0,3	31	0,441
P5, P6	1,091	0,307	813	0,377
P5, P2	1,2047	0,133	564	0,282
P5, P3	1,3123	0,062	31	0,201
P5, P1	1,1567	0,153	331	0,329
P6, P2	1,6363	0,148	26	0,194
P6, P3	2,115	0,099	24	0,098
P6, P1	1,9986	0,059	102	0,1
P2, P3	Não testado			
P2, P1	Não testado			
P3, P1	Não testado			

Tabela S10. Teste pairwise elaborado com os dados do número de exemplares de ovos e os meses de amostragens.

Meses	t	P(Perm)	Unique	
			perms	P(MC)
dez, jan	2,6355	0,001	997	0,001
dez, fev	1,6799	0,022	997	0,052
dez, nov	1,6922	0,054	999	0,086
jan, fev	1,5078	0,041	999	0,054
jan, nov	1,9573	0,004	997	0,017
fev, nov	1,769	0,065	979	0,117

Tabela S11. Teste pairwise elaborado com os dados do número de exemplares de larvas e os meses de amostragens.

Meses	t	P(Perm)	Unique perms	P(MC)
jan, fev	1,6178	0,001	998	0,038
jan, nov	2,3471	0,001	997	0,003
jan, dez	1,8458	0,001	997	0,014
fev, nov	Não testado			
fev, dez	0,91812	0,677	205	0,573
nov, dez	Não testado			

Tabela S12. Análise de SIMPER para ovos das espécies com maior contribuição na similaridade entre os meses de amostragens. Resultados da dissimilaridade (%) das sete espécies de peixes que mais contribuíram em cada análise.

Espécies	Abundância média		Contrib. %	Espécies	Abundância média		Contrib. %	Espécies	Abundância média		Contrib. %
DM = 84,19	Nov	Dez		DM = 99,28	Dez	Jan		DM = 99,70	Nov	Jan	
Ilab	0,1	0	19,39	Atri	0	1,31	22,2	Atri	0	1,31	21,02
Smac	0,14	0	17,01	Lpar	0	0,93	15,83	Lpar	0	0,93	15,01
Pfur	0,11	0,05	16,27	Loct	0	0,84	15,48	Loct	0	0,84	14,66
Bsp.	0,06	0,07	14,07	Pmac	0,02	0,68	10,54	Pmac	0	0,68	10,03
Etri	0,07	0,02	10,34	Plin	0	0,39	8,75	Plin	0	0,39	8,21
Skri	0,07	0	7,7	Cnae	0	0,43	5,56	Cnae	0	0,43	5,35
Parg	0	0,06	7,61	Alac	0	0,32	4,55	Alac	0	0,32	4,36
DM = 96,38	Dez	Fev		DM = 99,07	Nov	Fev		DM = 97,31	Jan	Fev	
Pfur	0,05	0,27	19,36	Pfur	0,11	0,27	17,9	Atri	1,31	0	20,41
Pmac	0,02	0,16	17,74	Ilab	0,1	0	14,05	Lpar	0,93	0	14,57
Parg	0,06	0,27	13,61	Smac	0,14	0	11,95	Loct	0,84	0	14,21
Bsp.	0,07	0	10,88	Pmac	0	0,16	11,68	Pmac	0,68	0,16	10,06
Lfri	0	0,14	8,78	Lfri	0	0,14	7,36	Plin	0,39	0	7,93
Pstr	0	0,03	8,71	Bsp.	0,06	0	6,55	Cnae	0,43	0	5,22
Snas	0	0,27	6,5	Parg	0	0,27	5,95	Alac	0,32	0	4,25

Pmac= *Pimelodus maculatus*; Pfur= *Pimelodus fur*; Atri= *Astyanax trierythropterus*; Smac= *Serrasalmus maculatus*; Plin= *Prochilodus lineatus*; Loct= *Leporinus octofasciatus*; Bsp.= *Bryconamericus spp.*; Parg= *Piabina argentea*; Lpar= *Leporinus paranensis*; Cnae= *Cyphocharax nagelii*; Etri= *Eingenmannia trilineata*; Ilab= *Iheringichthys labrosus*; Skri= *Serrapinus kriegi*; Alac= *Astyanax lacustris*; Lfri= *Leporinus friderici*; Snas= *Schizodon nasutus*. DM = Dissimilaridade média.

Tabela S13. Análise de SIMPER para larvas das espécies com maior contribuição na similaridade entre os meses de amostragens. Resultados da dissimilaridade (%) das sete espécies de peixes que mais contribuíram em cada análise.

Pmac= *Pimelodus maculatus*; Pfur= *Pimelodus fur*; Atri= *Astyanax trierythropterus*; Pstr= *Piabarchus stramineus*; Plin= *Prochilodus lineatus*; Mobt=

Espécies	Abundância média		Contrib. %	Espécies	Abundância média		Contrib. %	Espécies	Abundância média		Contrib. %
DM = 83,20	Nov	Dez		DM = 97,06	Dez	Jan		DM = 90,31	Nov	Jan	
Pfur	1,5	0,28	38,45	Pmac	0,04	2,55	28,87	Pmac	0	2,55	23,69
Mobt	0,42	0	12	Atri	0,01	1,48	16,51	Pfur	1,5	0,44	15,37
Ilab	0,29	0,04	11,35	Pten	0	1,15	14,88	Atri	0,14	1,48	13,23
Apir	0,28	0	10,51	Pfur	0,28	0,44	7,82	Pten	0	1,15	11,69
Ppir	0,25	0,2	9,28	Pmee	0	0,83	7,02	Pmee	0	0,83	6,23
Pstr	0,13	0,22	7,01	Plin	0	0,22	5,89	Mobt	0,42	0,31	6,18
Pcor	0,11	0	4,21	Mobt	0	0,31	3,5	Plin	0	0,22	3,94
DM = 88,32	Dez	Fev		DM = 85,24	Nov	Fev		DM = 82,05	Jan	Fev	
Pmac	0,04	1,08	32,01	Pfur	1,5	0,7	33,02	Pmac	2,55	1,08	28,4
Pfur	0,28	0,7	22,12	Pmac	0	1,08	18,22	Atri	1,48	0,27	16,88
Pstr	0,22	0,11	12,71	Mobt	0,42	0,13	9,96	Pten	1,15	0	15,07
Atri	0,01	0,27	12,26	Ilab	0,29	0	8,4	Pfur	0,44	0,7	10,39
Ppir	0,2	0	7,53	Apir	0,28	0	7,94	Pmee	0,83	0	7,5
Pcor	0	0,07	4,04	Atri	0,14	0,27	7,28	Plin	0,22	0,01	5,64
				Ppir	0,25	0	5,67	Mobt	0,31	0,13	4,31

Megaleporinus obtusidens; Ilab= *Iheringichthys labrosus*; Apir=*Apareiodon piracicabae*; Ppir=*Pinirampus pirinampu*; Pcor=*Pseudoplatystoma corruscans*; Pten= *Phenacorhamdia tenebrosa*; Pmee=*Pimelodella meeki*. DM = Dissimilaridade média.

Tabela S14. Análise de SIMPER para ovos das espécies com maior contribuição na similaridade entre os pontos de amostragens. Resultados da similaridade (%) das espécies de peixes que mais contribuíram.

Espécies	Abundância média	Similaridade média	% contribuição
P1			
SM: 31,98			
Pfur	1,94	18,64	58,28
Pmac	1,92	12,12	37,91
P2			
SM: 27,41			
Pfur	0,98	23,6	86,12
Pmac	1,61	3,72	13,57
P3			
SM: 19,21			
Pfur	0,18	7,98	41,55
Pmac	1,62	7,9	41,13
Pcor	0,63	1,94	10,1
P4			
SM: 6,28			
Atri	0,71	3,74	59,46
Pstr	0,12	2,42	38,57
P5			
SM: 11,62			
Pten	1,87	4,7	40,4
Atri	1,5	3,39	29,2
Pmac	1,17	1,89	16,23
Pstr	0,3	1,65	14,17
P6			
SM: 10,43			
Pstr	0,22	4,93	47,27
Atri	0,47	2,68	25,72
Pten	0,62	1,7	16,32
Alac	0,17	1,09	10,44

Pmac= *Pimelodus maculatus*; Pfur= *Pimelodus fur*; Atri= *Astyanax trierythropterus*; Pcor= *Pseudoplatystoma corruscans*; Pstr= *Piabarchus stramineus*; Pten= *Phenacorhamdia tenebrosa*; Alac= *Astyanax lacustris*. SM = Similaridade média.

Tabela S15. Análise de SIMPER para ovos das espécies com maior contribuição na similaridade entre os meses de amostragens. Resultados da similaridade (%) das espécies de peixes que mais contribuíram.

Espécies	Abundância média	Similaridade média	% contribuição
Nov			
SM: 29,42			
Pfur	1,5	24,27	82,49
Atri	0,14	2,94	9,98
Dez			
SM: 19,15			
Pfur	0,28	14,05	73,36
Ppir	0,2	2,65	13,84

Pstr	0,22	2,45	12,8
Jan			
SM: 29,23			
Pmac	2,55	14,39	49,21
Atri	1,48	8,08	27,62
Pten	1,15	4,41	15,07
Fev			
SM: 15,57			
Pmac	1,08	10,34	66,39
Pfur	0,7	2,65	17,04
Pstr	0,11	1,24	7,99

Pmac= *Pimelodus maculatus*; Pfur= *Pimelodus fur*; Atri= *Astyanax trierythropterus*; Pstr=*Piabarchus stramineus*; Pten=*Phenacorhamdia tenebrosa*; Ppir=*Pinirampus pirinampu*. SM = Similaridade média.

Tabela S16. Análise de SIMPER para larvas das espécies com maior contribuição na similaridade entre os pontos de amostragens. Resultados da similaridade (%) das espécies de peixes que mais contribuíram.

Espécies	Abundância média	Similaridade média	% contribuição
P1			
Todas as similaridades são zero			
P2			
SM: 20,23			
Pfur	0,09	20,23	100
P3			
Todas as similaridades são zero			
P4			
Similaridade média: 10,80			
Loct	0,75	5,11	47,31
Lpar	1,38	3,97	36,8
Pfur	0,46	1,72	15,89
P5			
Similaridade média: 5,85			
Atri	0,93	2,47	42,28
Parg	0,06	1,84	31,38
Pmac	0,14	1,11	18,9
P6			
Similaridade média: 5,92			
Atri	0,97	2,83	47,75
Pmac	0,88	2,39	40,32
Cnae	0,26	0,71	11,93

Pmac= *Pimelodus maculatus*; Pfur= *Pimelodus fur*; Atri= *Astyanax trierythropterus*; Lpar=*Leporinus paranensis*; Loct=*Leporinus octofasciatus*; Parg= *Piabina argentea*; Cnae=*Cyphocharax nagelii*. SM = Similaridade média.

Tabela S17. Análise de SIMPER para larvas das espécies com maior contribuição na similaridade entre os meses de amostragens. Resultados da similaridade (%) das espécies de peixes que mais contribuíram.

Espécies	Abundância média	Similaridade média	% contribuição
Nov			
SM: 25,50			
Ilab	0,1	9,58	37,58
Smac	0,14	8,87	34,78
Pfur	0,11	7,05	27,63
Dez			
SM: 10,85			
Pfur	0,05	6,15	56,69
Bsp.	0,07	2,86	26,38
Parg	0,06	1,84	16,93
Jan			
SM: 22,65			
Atri	1,31	7,89	34,84
Lpar	0,93	5,22	23,06
Loct	0,84	5,04	22,25
Pmac	0,68	2,75	12,13
Fev			
SM: 1,59			
Pmac	0,16	1,59	100

Pmac= *Pimelodus maculatus*; Pfur= *Pimelodus fur*; Atri= *Astyanax trierythropterus*; Lpar= *Leporinus paranensis*; Loct= *Leporinus octofasciatus*; Parg= *Piabina argentea*; Ilab= *Iheringichthys labrosus*; Smac= *Serrasalmus maculatus*; Bsp.= *Bryconamericus spp.* SM = Similaridade média.