

**SUZYMEIRE BARONI**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES DE *Rhamdia*  
(SILURIFORME, HEPTAPTERIDAE) UTILIZADAS PARA  
REPOVOAMENTO DE RIOS NO ESTADO DO PARANÁ**

**MARINGÁ  
PARANÁ- BRASIL  
DEZEMBRO-2009**

**SUZYMEIRE BARONI**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES DE *Rhamdia*  
(SILURIFORME, HEPTAPTERIDAE) UTILIZADAS PARA  
REPOVOAMENTO DE RIOS NO ESTADO DO PARANÁ**

**Tese apresentada a Universidade Estadual  
de Maringá, como parte das exigências do  
Programa de Pós Graduação em Genética  
e Melhoramento, para obtenção do título  
de Doutor.**

**MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
DEZEMBRO-2009**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B266v Baroni, Suzymeire, 1963-  
Variabilidade genética em espécies de *Rhamdia*  
(Siluriforme, Heptapteridae) utilizadas para  
repopoamento de rios no estado do Paraná / Suzymeire  
Baroni. -- Maringá, 2009.  
66 f. : il., figs. (algumas color.)

Orientador : Prof. Dr. Erasmo Renesto.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento,  
2009.

1. Jundiá (*Rhamdia* spp) - Variabilidade genética -  
Repopoamento - Paraná. 2. Isoenzimas - Eletroforese -  
Jundiá (*Rhamdia* spp). I. Renesto, Erasmo, orient. II.  
Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 21.ed. 576.58

Dedico este trabalho a Deus, pois Ele me proporcionou brisa de paz quando vieram tempestades, óleo de alegria em meio a muitas lágrimas e um acalento quando pensei que não tinha mais esperanças.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, uma palavra de gratidão a Deus. Durante o período de doutorado, muitas lutas surgiram e se não fosse a presença Dele, sequer teria saúde para chegar até aqui.

À Universidade Estadual de Maringá, pelo suporte didático e acadêmico para concluir meus estudos, desde a Graduação, Especialização, Mestrado e agora o Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, que sempre prezou pela excelência do curso.

Ao meu orientador e mentor, professor doutor Erasmo Renesto, que teve paciência e sabedoria para me ensinar as coisas mais básicas da Eletroforese de Isoenzimas até as virtudes da calma e humildade no processo de aprendizado.

Aos meus professores, docentes das disciplinas do Programa, que conduziram minha trajetória rumo ao conhecimento. Foi um tempo de grande aprendizagem.

Aos professores co-orientadores e aos membros da banca, que muito contribuíram para o término da tese.

À Universidade Paranaense, Campus de Toledo, na qual trabalho, que cedeu o Laboratório de Biotecnologia para realização de parte dos experimentos, além da ajuda de custo nos dois últimos anos.

Aos meus pais, que sempre me amaram e acolheram nos momentos de luta.

À minha filha, a doce Ana, que entendeu minha ausência e meus sonhos.

Ao meu marido, Rodrigo, que simplesmente permaneceu ao meu lado nos momentos em que eu sorria e chorava.

Aos meus irmãos, por existirem na minha história.

À minha nova família, a família Barcelos, que me acolheu como filha e tem me dado suporte, amor e carinho.

À minha amiga Izabel Soares, pela sua força, incentivo e amizade incondicional.

Ao professor doutor Paulo Vanderlei Sanches, pela ajuda na elaboração deste trabalho, com auxílio precioso em todas as etapas.

Aos meus amigos de trabalho que me ajudaram a cumprir meus compromissos: Suzana Stefanello, Paulo Vanderlei Sanches, Lucimar Bonett, Juliana Wenzel, Weferson Juno da Graça e Maxwell Abbeg.

Aos meus alunos, Rodrigo Patera Barcelos, Renato Ortolan e Eliete Hurmann, que comigo se fizeram presentes durante as eletroforeses no laboratório e nos cuidados com meus peixes.

À COPEL, Estação de Salto Segredo, por ceder as espécies endêmicas do Rio Iguaçu para o experimento.

Ao CPAA-IAP (Centro de Pesquisa de Aqüicultura Ambiental) pela cessão das espécies endêmicas do Rio Paraná.

Ao Biólogo e funcionário do IAP Biólogo Elécio Vidal , por fornecer informações valiosas para este estudo.

Ao professor doutor Gilmar Baumgartner, da UNIOESTE de Toledo, pelas contribuições preciosas.

A todos que de alguma maneira contribuíram para que eu alcançasse meu objetivo.

**OBRIGADA.**

## BIOGRAFIA

SUZYMEIRE BARONI, filha de Ubirajara Baroni e Eloisa de Lima Baroni nasceu em Rolândia, Estado do Paraná, em 18 de maio de 1963.

Em dezembro 1977, concluiu o Ensino Fundamental e, em dezembro de 1980, concluiu o Ensino Médio, ambos no Colégio Estadual Souza Naves, em Rolândia - PR.

Em agosto de 1992, concluiu o curso de Graduação em Ciências Biológicas, na Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá-PR.

Em 1998, iniciou um Curso de Pós Graduação *Latu Sensu* em Genética e Evolução oferecido pelo Departamento de Biologia e Genética da Universidade Estadual de Maringá, concluído em 2000.

Ainda em 2000, foi aceita como aluna regular no curso de Pós Graduação em Agronomia, *Strictu Sensu*, oferecido pelo Programa de Pós Graduação em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá e teve bolsa oferecida pela CAPES. Em 2002, defendeu sua Dissertação, obtendo o título de mestre em Agronomia.

Em 2005, ingressou no Curso de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, na Universidade Estadual de Maringá.

Atualmente, é professora da Universidade Paranaense, Campus de Toledo - PR.

## ÍNDICE

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Família Heptapteridae .....	3
2.2. Gênero <i>Rhamdia</i> .....	3
2.3. Cultivo de espécie do gênero .....	6
2.4. Uso de marcadores moleculares em programas de repovoamento .....	9
2.5. Eletroforese de isoenzimas .....	13
2.6. Eletroforese em gel de amido .....	15
2.7. Eletroforese de isoenzimas e suas aplicações .....	17
2.8. Variabilidade genética de populações naturais .....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.1. Locais de coleta .....	29
3.2. Caracterização das amostras .....	30
3.4. Eletroforese em gel de amido .....	32
3.5. Análise dos dados .....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5. CONCLUSÕES .....	45
APÊNDICE .....	60

## RESUMO

BARONI, Suzymeire. D.Sc. Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2009. **Variabilidade genética em espécies de *Rhamdia* (Siluriforme, Heptapteridae) utilizadas para repovoamento de rios do estado do Paraná.** Professor Orientador: Erasmo Renesto. Professores Conselheiros: Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki e Claudete Aparecida Mangolin.

O cultivo de *Rhamdia* spp, também conhecido como jundiá, tem aumentado muito no sul do Brasil, pois sua reprodução induzida apresenta bons resultados e altas taxas de fecundação em programas de repovoamento. O monitoramento genético dos estoques envolvidos nestes projetos é essencial para minimizar as mudanças genéticas que podem ocorrer em consequência de endogamia, deriva genética e adaptações a condições de cultivo. Este trabalho teve por objetivo avaliar a variabilidade genética em espécies de *Rhamdia* spp utilizadas em programas de repovoamento de rios do estado do Paraná através de marcadores isoenzimáticos. Foram coletados 30 indivíduos de cada espécie, *R. branneri*, *Rhamdia quelen* e *R. voulezi*, em dois tanques de pisciculturas do estado do Paraná. A análise de eletroforese de 11 sistemas, das três espécies analisadas, detectou 19 *loci*, com 60% de *loci* polimórficos. Os valores de heterozigosidade observada e esperada se mostraram muito acima da média para peixes (0,05). O valor de  $F_{IS}$  de Sewall Wright mostrou que na média das três espécies há um excesso de homozigotos em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os dados sugerem que embora as espécies estejam se reproduzindo em cativeiro elas ainda apresentam uma alta variabilidade genética.

Palavras-chave: Jundiá, marcadores isoenzimáticos, variabilidade genética, polimorfismo, heterozigosidade

## ABSTRACT

BARONI Suzymeire. D. Sc. University of Maringá, December 2009. **Genetic variability in species of *Rhamdia* (Siluriformes, Heptapteridae) used for restocking of rivers of the state of Parana.** Teacher Advisor: Erasmo Renesto. Faculty Advisors: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki and Claudete Ali Mangolin.

The cultivation of *Rhamdia* spp, also known as jundiá, it has increased in south of Brazil, because its induced reproduction shows good results and high fecundation rates in repopulation programs. The genetic monitoring of stocks involved in these projects is essential to minimize the genetic changes that may occur as a result of inbreeding, genetic drift and adaptation to cultivation conditions. This study aimed to evaluate the genetic variability in species of *Rhamdia* spp used in stocking programs of rivers in the state of Paraná through isoenzymatic markers. It was collected 30 individuals of each species, *R. branneri*, *Rhamdia quelen*, and *R. voulezi* in two tanks of fish culture in the state of Paraná. The electrophoresis analysis of 11 systems, among the three species analyzed, it was detected 19 loci, with 60% of polymorphic loci. The values of heterozygosity observed and expected were much above average for fish (0.05). The value of Sewall Wright's  $F_{IS}$  showed that in the average of the three species there is an excess of homozygotes in relation to the expected by the Hardy-Weinberg equilibrium. The data suggest that although the species are reproducing in captivity, they still have a high genetic variability.

**Key words:** Jundiá, Isoenzymatic markers, Genetic variability, Polymorphism, Heterozygosity

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes desempenham papel fundamental enquanto componentes do ecossistema, participando da ciclagem de nutrientes e do fluxo de energia como alimento básico para muitas aves e animais. Em função de sua expressiva diversidade de espécies, a ictiofauna constitui um valioso banco genético, estratégico para aplicações futuras (Vendel et al., 2005). As alterações ambientais, climáticas e principalmente antropogênicas têm reduzido as populações naturais de peixes.

Segundo Barrero et al. (2008a), uma das ferramentas utilizadas na conservação da ictiofauna dos rios é a implantação de programas de repovoamento. Apesar destes programas serem bem aceitos pela comunidade e pesquisadores, é importante o seu monitoramento genético e biológico, uma vez que o processo de repovoamento, sem critérios específicos, pode representar riscos genéticos nas populações naturais (Sonstebo et al., 2007).

O monitoramento genético dos estoques envolvidos em projetos de repovoamento é essencial porque, mesmo que sejam seguidos à risca os procedimentos de manejo recomendados, com esses métodos pode-se minimizar as mudanças genéticas mais substanciais em consequência de endogamia, deriva genética e adaptações às condições de cultivo (Toledo-Filho et al., 1992).

Um programa de monitoramento genético envolve a análise de características que, direta ou indiretamente, reflitam a composição genética dos estoques usados no programa de repovoamento. A eletroforese de proteínas constitui uma das técnicas mais eficientes para a análise genética de populações de peixes, por isso é aconselhada para monitoramento de estoques de aquicultura (Ryman e Utter, 1987).

O cultivo de *Rhamdia* spp tem aumentado muito no sul do Brasil, pois sua reprodução induzida apresenta bons resultados e altas taxas de fecundação. Também tem sido utilizado em programas de repovoamento na bacia do rio Paraná e no rio Iguaçu. Segundo Radünz Neto (1981), este peixe possui boa aceitação no

mercado consumidor, boa produtividade em açudes e alto potencial de comercialização, tornando-se uma opção para o fomento da piscicultura.

Esse gênero ainda traz inúmeras controvérsias quanto a sua sistemática. Silfvergrip (1996) realizou uma ampla revisão taxonômica, baseada em caracteres da morfologia interna e externa e concluiu que o gênero *Rhamdia* é formado por apenas 11 espécies dentro das 100 anteriormente descritas. O mesmo autor ainda considera que a espécie *Rhamdia quelen* possui 49 sinonímias, entre elas *Rhamdia branneri* e *Rhamdia voulezi*.

Três espécies têm sido utilizadas em programas de repovoamento no Paraná. *Rhamdia quelen*, do Rio Paraná, é cultivada nos tanques do CPAA (Centro de Pesquisa de Aqüicultura Ambiental) - IAP na cidade de Toledo, oeste do Paraná, e as outras duas espécies nativas do Rio Iguaçu, *Rhamdia branneri* e *Rhamdia voulezi*, são cultivadas em tanques da estação de piscicultura da COPEL em Salto Segredo na região Sudoeste do Paraná.

Ambos os programas não fazem monitoramento genético dos planteis e este trabalho propõe uma avaliação genético-bioquímica, por meio de marcadores isoenzimáticos dos indivíduos do gênero *Rhamdi*, cultivados nos tanques e utilizados em programas de repovoamento do rio Iguaçu e em outros rios da bacia do rio Paraná- PR, objetivando avaliar a variabilidade genética desses indivíduos mantidos em cativeiro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Família Heptapteridae

Heptapteridae é a segunda família da ordem Siluriforme em número de espécies que abriga 25 gêneros além de *Rhamdia* (objetivo de nosso estudo) com 186 espécies validas (Bockmann e Guazzelli, 2003).

Os membros da família Heptapteridae são de pequeno a médio porte, possuem três pares de barbilhões, sendo um maxilar e dois mentonianos e a nadadeira adiposa é bem desenvolvida (Bockmann e Guazzelli, 2003).

Heptapteridae são endêmicos da região neotropical, sendo uma das famílias mais representativas dos Siluriformes. Ocorrem em rios que drenam o Oceano Atlântico, a partir do Norte do México ao sul da Argentina, encostas do Pacífico, a partir do norte do México ao sul do Peru (Bockmann e Guazzelli, 2003). Algumas espécies têm ampla distribuição por toda esta área, por exemplo, *R. quelen*.

A maior parte desta família tem, principalmente, atividade noturna (Costa, 1987; Caramaschi, 1991; Cassati e Castro, 1998). Membros dessa família tendem a ser solitários ou se organizam em grupos de até 10 indivíduos.

Ainda segundo Bockmann e Guazzelli (2003), ecologicamente, Heptapteridae não difere da maioria dos outros Siluriformes, sendo normalmente adaptado à vida bentônica. No geral, estas espécies vivem em rios de pequeno a médio porte, ocupando profundidades baixa e média. Algumas vivem em fendas rochosas ou então associadas à vegetação marginal.

Dimorfismo sexual não está presente, ou então é pouco desenvolvido nesta família (Bockmann e Guazzelli, 2003). Os juvenis da maioria das espécies são réplicas em miniatura dos indivíduos adultos, sendo bastante férteis e não apresentam cuidado parental.

### 2.2. Gênero *Rhamdia*

O cultivo de *Rhamdia* tem aumentado muito no sul do Brasil, pois sua reprodução induzida apresenta bons resultados e altas taxas de fecundação. Também

tem sido utilizado em programas de repovoamento na bacia do rio Paraná e no rio Iguaçu. Popularmente, é conhecido como jundiá, jundiá-tinga, mandi e sapipoca no Brasil; na Argentina como: bagre, bagre negro, bagre sapo e bagre (Gomes et al. 2000).

Na última estatística de pesca do IBAMA (2007), constatou-se que em 2005 o jundiá foi o segundo peixe mais pescado artesanalmente e o terceiro mais produzido pela aqüicultura continental de água doce, mas ainda bem abaixo da carpa, que está em primeiro lugar.

Segundo Silva et al. (2008) apesar do extremo potencial da *R. quelen* para a piscicultura no Sul do país, ainda faltam muitas informações para a implantação de processo de cultivo, principalmente na área de genética molecular.

Anza (2006) relata que *Rhamdia* foi originalmente descrito em 1858 por Bleeker e tem como espécie-tipo *Rhamdia sebae* (Cuvier, 1829), mas a história do gênero teve início mais de dois séculos antes destas publicações. A primeira espécie de *Rhamdia* foi provavelmente “nhamdiã” descrita em latim no ano de 1648 por Marcgravius. “Nhamdiã” provém de um nome de origem tupi-guarani e seus exemplares foram, provavelmente, coletados ao longo de rios do nordeste brasileiro. Desde 1648 muitos outros autores (Bloch, 1794; La Cepède, 1803; Humboldt & Valenciennes, 1821) descreveram espécies que mais tarde seriam reconhecidas como pertencentes ao gênero *Rhamdia*. Cabe ressaltar que não existe consenso acerca da identificação de muitos desses exemplares descritos nos séculos XVII e XVIII, pois tais descrições são extremamente vagas e as séries de material-tipo foram perdidas ou nunca foram estabelecidas.

Conforme Silfvergrip (1996), o gênero *Rhamdia* pertence à seguinte divisão taxonômica: Classe: Osteichthyes, Ordem Siluriforme, Família: Pimelodidae, Gênero: *Rhamdia*.

Entretanto, Bockmann e Guazelli (2003) fazem inclusão do gênero *Rhamdia* dentro desta família, o que tem sido adotado pelos autores nos últimos anos.

A sistemática do gênero é confusa desde que foi descrita. Uma ampla revisão taxonômica, realizada por Silfvergrip (1996), baseada em caracteres da

morfologia interna e externa, permitiu que o autor concluísse que o gênero *Rhamdia* é formado por apenas 11 espécies dentro das 100 anteriormente descritas.

Morfologicamente, o jundiá caracteriza-se por possuir boca viliformes e corpo sem escamas, possuindo barbilhões de forma cilíndrica com comprimento variando proporcionalmente ao tamanho do espécime (Guedes, 1980).

A coloração do jundiá varia de marrom avermelhado claro a cinza ardósia. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável, os barbilhões têm crescimento alométrico negativo e esta relação é aumentada devido à grande possibilidade de dano dos barbilhões em exemplares grandes (Silfvergrip, 1996).

*Rhamdia quelen* vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos de onde saem à noite, à procura de alimento (Guedes, 1980). Em experimentos com larvas e alevinos dessa espécie em cativeiro, observou-se uma acentuada aversão à luz e busca de locais escuros (Piaia et al., 1999).

A reprodução desta espécie é anual; a desova é assincrônica, ou seja, os óvulos são liberados em várias ocasiões do período reprodutivo e pode ser induzida pela aplicação de hormônios. A eclosão dos ovos ocorre em torno de 27 a 36 horas após a fertilização e o desenvolvimento embrionário completa-se em 48 horas (abertura da boca) quando a larva possui 5 mm (Parra et al., 2008).

Atualmente, as técnicas de reprodução do jundiá em cativeiro estão bem esclarecidas, faltando algumas determinações relacionadas à nutrição, aos sistemas de cultivo e ao melhoramento genético da espécie. Há relatos de migração de *R. quelen* (Lamas, 1993), mas isso pode ser no caso de amostras grandes, que efetuam movimentos moderados.

A espécie *Rhamdia quelen*, apesar de nativa, é ainda pouco conhecida cientificamente, mas tem atraído a atenção de produtores e pesquisadores devido a várias características favoráveis à sua inclusão na lista de peixes criados comercialmente no país (Carneiro e Mikos, 2005).

Pelicice et al. (2005), em estudo sobre a diversidade de peixes das planícies de inundação do alto rio Paraná, mostra a presença expressiva de indivíduos da família Heptapteridae citando o gênero *Rhamdia* como exemplo.

Kantek et al. (2007), discorrendo sobre dados cariotípicos de peixes no Rio Iguazu, mostraram as divergências encontradas quanto ao Gênero *Rhamdia* e dados de variação de cariótipos apóiam a hipótese de Sifvergrip (1996), porém sugerem que as espécies *R. branneri* e *R. voulezi* podem ser agrupadas independentes da espécie *R. quelen*, devido às diferenças das NORs (Regiões Organizadoras de Nucléolos), ao contrário do que sugere Silfvergrip (1996).

Segundo Abucarma e Martins-Santos (2001), as diferenças entre os cromossomos B encontradas em seus estudos sugerem que *R. quelen*, *R. voulezi* e *R. branneri* são espécies distintas.

Em um levantamento da ictiofauna da Bacia do alto Rio Iguazu, feito por Ingênilo et al. (2004), está descrito *R. quelen* como espécie endêmica e há a menção de que essa classificação englobaria *R. branneri* e *R. voulezi* descrita anteriormente por Haseman (1911).

### **2.3. Cultivo de espécie do gênero**

A piscicultura tem crescido muito no sul do Brasil, incrementando a economia e oferecendo alternativas na dieta da população. Estudos têm sido feitos a fim de maximizar o cultivo de *Rhamdia* sp, contribuindo com dados relevantes neste processo.

Fracalossi et al. (2004) avaliaram o potencial da *Rhamdia quelen* para exploração em aqüicultura no sul do Brasil. Para isso, foram utilizados parâmetros como velocidade de crescimento, conversão alimentar, diferença de crescimento entre machos e fêmeas e resistência a manejo. Seus resultados mostraram que *R. quelen* apresentou grande potencial para aqüicultura, aceitando bem o manejo, apresentando boa conversão do alimento, além de não cessar o crescimento no inverno.

Um estudo visando futuras metas de melhoramento de espécies do gênero *Rhamdia* foi feito por Silva et al. (2007), que objetivaram o seqüenciamento da

região codificadora do gene do hormônio do crescimento do jundiá. Esse hormônio tem especial importância no crescimento desses peixes. Recombinantes desse hormônio geram interesse na aquicultura, devido ao incremento de apetite, eficiência alimentar e taxa de crescimento, sendo estas características importantes para peixes de interesse comercial.

O rio Uberabinha, Uberlândia- MG apresenta na sua ictiofauna um número expressivo de indivíduos de *R. quelen* (Guilherme et al., 2007). Os autores avaliaram aspectos de interesse zootécnico e biológico desta espécie usando como parâmetros indução artificial de ovulação e produção de alevinos com reprodutores capturados no leito do rio. Seus resultados mostraram que a espécie apresenta boa resposta à indução da ovulação com grande número de alevinos.

Com objetivo de avaliar o desempenho de *R. quelen*, cultivados em sistema de redes, Reidel (2007) utilizou dietas com três níveis protéicos e dois energéticos como variáveis. Seus resultados mostraram que os melhores índices de desempenho foram verificados para os peixes que receberam a dieta contendo 30% de proteína bruta. Resultados assim são importantes para produtores a fim de aumentar sua produtividade.

Graeff et al. (2009) também avaliaram dietas protéicas contendo diferentes níveis de energia na fase pós-larvas de *R. quelen*. Os autores usaram três dietas isoprotéicas formuladas para conter uma relação 1:80, 1-90 e 1-100 Kcal de energia metabolizável por Kg de ração. Os resultados indicam que a relação proteína/energia que melhor se ajusta para os jundiás na fase pós-larva a alevino é de 1:80.

Carneiro e Mikos (2005) avaliaram a frequência alimentar em *R. quelen* como fator importante no manejo em pisciculturas. Testaram quatro regimes de arraçoamento em intervalos regulares. Os resultados mostraram que é possível obter o mesmo crescimento de alevinos de jundiá fornecendo alimento apenas uma vez ao dia. Esses dados contribuem para otimização dos recursos necessários à produção comercial do jundiá em cativeiro.

Para testar diferentes fontes protéicas em dietas práticas em alevinos de *R. quelen*, foram realizados dois experimentos com 320 animais, durante 42 dias

(Coldebella e Neto, 2002). Os autores testaram quatro dietas protéicas diferenciadas, estabelecendo, ao final do experimento, a dieta que proporcionou aos alevinos de jundiá melhor crescimento e ganho de peso.

Comparando a sobrevivência e desempenho do jundiá cinza e albino, os peixes foram colocados sob condições de controle em tanques na estação de piscicultura do Chasqueiro, Arroio Grande-RS (Souza et al. 2005). Os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada (PB 36%) na ordem de 3% da biomassa ao dia. As variáveis avaliadas foram ganho de peso, crescimento e sobrevivência. Os resultados avaliados após 135 dias mostram que o jundiá cinza apresentou melhor desempenho produtivo. Esses dados colaboram para um melhor conhecimento do potencial da espécie em sistemas de produção intensiva.

Com a finalidade de avaliar o desempenho do jundiá em diferentes sistemas de cultivo, na região de Santa Catarina, Junior et al. (2008) utilizou 11 tanques de terra escavados. Neles, os jundiás foram separados em tanques com mono-cultivo, tanques com bi-cultivo e tanques com poli-cultivos. Seus dados constaram de valores de ganho de peso, ganho de biomassa, taxa de crescimento, de sobrevivência e conversão alimentar. Seus resultados mostraram que, para o jundiá, o sistema de cultivo que apresentou melhor desempenho no conjunto dos parâmetros analisado foi o mono-cultivo.

As características hematológicas de *R. quelen* oriundo de cativeiro foram estudadas por Dias et al. (2002). Foi determinado o valor médio de eritrócitos, taxa de hemoglobina, hematócrito e avaliados outros valores hematológicos importantes no desenvolvimento dos indivíduos em cativeiro. Os resultados deste estudo fornecem valores sanguíneos normais em *R. quelen* em cultivo intensivo, dados estes que poderão servir de comparação com dados dessa espécie em outras situações de cultivo.

Piaia e Baldisseroto (2000) avaliaram o efeito da Densidade de Estocagem (DE) sobre o crescimento de alevinos de *R. quelen*. A DE pode afetar de maneira significativa o crescimento de alevinos, fazendo-se necessário uma avaliação de melhores parâmetros de DE para um bom desempenho no manejo dos peixes. Os

resultados dos autores mostraram que é mais vantajoso criar alevinos de jundiá em circuito fechado na DE de 454 alevinos/m<sup>3</sup> do que em DE menores.

A resposta de peixes, em cativeiro, às variações de pH é muito importante (Ferreira et al., 2001), sendo poucas informações sobre a resposta de *R. quelen* em relação às variações de pH. Os autores avaliaram o desenvolvimento de ovos e larvas de jundiá, submetidos a seis tratamentos com pH, 4,5,6,7,8,e 9, em três desovas. Os resultados indicam que a taxa de sobrevivência sofreu influência do pH nas diferentes condições de temperatura da água.

Os programas de repovoamento devem ser associados aos programas de melhoramento genético a fim de contribuir na qualidade da alimentação das comunidades pesqueiras, além de oferecer alimento protéico de boa qualidade nutritiva (Resende; Ribeiro e Lega, 2008).

#### **2.4. Uso de marcadores moleculares em programas de repovoamento**

As alterações ambientais e climáticas associadas às ações antropogênicas, têm reduzido populações naturais de peixes nos últimos anos. Uma das ferramentas utilizadas na conservação da ictiofauna dos rios é a implantação de programas de repovoamento (Barrero et al., 2008).

Na terminologia aquícola entende-se por peixamento a operação que tem por fim o povoamento, o repovoamento e a estocagem de coleções d'água com larvas, alevinos, juvenis e adultos de peixes, crustáceos, moluscos (Gurgel et al., 1988).

Sirol e Brito (2006) comentam que são vários os fatores que podem colaborar para a ausência de resultados significativos no repovoamento de espécies nativas no Brasil, destacando-se a falta de conhecimento da biologia e principalmente da ecologia das espécies autóctones.

Bert et al. (2004) ressalta que alguns desses programas envolvem diferentes estratégias de proteção às espécies-alvo, mais que simplesmente o repovoamento em si.

É importante o monitoramento genético e biológico desses programas, uma vez que o processo de repovoamento, sem critérios específicos, pode representar

riscos genéticos nas populações naturais (Sonstebo et al., 2007), podendo conduzir uma espécie à extinção (Agostinho, 2005).

Em função deste problema é necessário o desenvolvimento de manejos genéticos de progênes que direcionem os potenciais riscos genéticos para ações específicas do manejo, incluindo a seleção de reprodutores, acasalamentos e práticas de criação e liberação. Análises genéticas em estoques de pisciculturas e tanques destinados a repovoamento representam a obtenção de informações importantes de resultados expressivos na produção e conservação de peixes (Lopera-Barrero, 2005).

A diminuição de variabilidade genética reduz a capacidade que os peixes possuem de se adaptarem a diferentes condições ambientais (Povh, 2008). A manutenção da variabilidade genética é importante para a viabilidade dos programas de repovoamento com a finalidade de evitar efeitos adversos na icitiofauna (Barroso et al. 2005; Sirol e Brito, 2006). Neste contexto, marcadores moleculares são instrumentos eficientes para monitorar programas de repovoamento (Sekino et al., 2002; Ortega-Villaizán Romo et al., 2000) e auxiliar no manejo genético de pisciculturas, visando a diminuir e minimizar a endogamia e maximizar a variabilidade genética.

Uma revisão minuciosa sobre o papel de marcadores moleculares em manejo de peixes cultiváveis foi feito por Ferguson (1994). O autor discute as variáveis dos programas de repovoamento e o valor dos marcadores genéticos para manter a integridade genética das espécies nativas usadas nos programas (Ferguson et al., 1998).

Toledo-Filho et al. (1992) faz menção do grande número de metodologias disponíveis para avaliar e monitorar a variabilidade genética em tanques de piscicultura. Cita os métodos genéticos bioquímicos e os genéticos moleculares, sugerindo que constituem os mais apropriados para a análise da estrutura populacional de peixes do programa de repovoamento.

O repovoamento com espécies nativas é uma exigência legal no Brasil. Porém, além disso, temos a legislação de proteção à biodiversidade brasileira que pressupõe que os alevinos apresentem o mesmo material genético das populações

selvagens do local (Sirol e Brito, 2006). Mas é sabido que o manejo pode alterar a composição genética de populações.

Nos projetos de repovoamento, lida-se com cinco tipos de estoques de peixes: doador, formado por populações selvagens; fundador, procedente de amostras extraídas do doador, que constituirão o plantel de reprodutores; reprodutor, amostra do estoque fundador efetivamente usada como geração P1; repovoador, constituído por amostras da progênie (geração F1); receptor, formado pela população de peixes já existentes no rio ou reservatório a ser repovoado (Toledo-Filho et al., 1992).

Segundo o mesmo autor, os projetos de repovoamento devem considerar vários fatores que se referem ao material genético da espécie escolhida para o programa. Ele cita a escolha correta do doador, no que diz respeito a conceito populacional, cuja integridade genética deseja-se preservar, e salienta que a variabilidade genética de uma espécie compreende não só a variação existente dentro da população local, mas também as divergências genéticas entre populações locais de uma ou várias bacias hidrográficas.

Toledo-Filho et al. (1992) afirmam que a escolha adequada de um estoque doador deve considerar a importância biológica das adaptações locais e da estrutura genético-populacional. Na ausência destas informações, não se tem idéia sobre os recursos genéticos disponíveis, tornando muito difícil o planejamento de um esquema racional visando ao repovoamento.

Em estudo realizado por Povh et al. (2008), foi analisada a diversidade genética de pacus de um programa de repovoamento no rio Paranapanema por meio de marcador RAPD (marcadores de polimorfismo de DNA amplificados ao acaso). Os autores observaram que havia uma menor diversidade genética do estoque de reprodutores em relação aos indivíduos do Rio Paranapanema.

Lidani et al. (2006) estimaram a variabilidade de uma população de *Rhamdia quelen* criada em cativeiro utilizando PCR-RAPD. Os resultados obtidos mostraram que os exemplares de *Rhamdia quelen* avaliados demonstraram um alto grau de polimorfismo genético, sugerindo que este estoque pode apresentar facilidades de adaptação a diferentes ambientes, especialmente em viveiros de

pisciculturas. Este estudo mostra ainda o potencial da técnica de PCR-RAPD na estimativa da variabilidade genética em populações de *R. quelen*, sendo uma importante ferramenta para direcionar programas de repovoamento da ictiofauna, bem como reconhecer a origem e as relações genéticas do estoque fundador de uma população, embora sendo este um marcador dominante.

Barrero et al. (2008a), empregando RAPD, determinou a variabilidade de seis lotes de peixes usados em programa de repovoamento em três estações de piscicultura nas cidades de Rolândia, Andirá e Palotina no estado do Paraná. Os resultados desse estudo mostraram que duas espécies analisadas, *Leporinus elongatus* e *Prochilodus lineatus*, apresentaram alta variabilidade, estimadas pelo índice de diversidade de Shannon, mas no lote de *Piaractus mesopotamicus* foi detectada uma baixa variabilidade. Dessa maneira, foi possível desenvolver um programa mais adequado para o repovoamento das estações de piscicultura.

Barrero et al. (2008b), com objetivo de analisar a variabilidade genética de dois estoques de alevinos de *Prochilodus lineatus* (Curimba) em programas de repovoamento do rio Paraná, utilizaram o marcador RAPD para análise. Seus resultados mostraram que a variabilidade genética entre os estoques de alevinos de *P. lineatus* teve uma baixa diferenciação genética, devido possivelmente ao efeito fundador e ao manejo reprodutivo.

Segundo Finnegan e Stevens (2008), que avaliaram os efeitos genéticos a longo prazo dos programas de estoques de *Salmo salar*, a técnica de suplementação de peixes nativos com peixes domesticados é prática comum, porém, ambos diferem tanto em termos ecológicos como genéticos e na natureza eles interagem em uma infinidade de maneiras, muitas vezes com repercussões negativas para a população nativa.

O CAAP/IAP-Toledo fornece indivíduos de *R. quelen* para a todos os tanques de piscicultura da região, além do programa de soltura de alevinos na bacia do rio Paraná e, segundo consta, nenhum monitoramento da diversidade genética foi feito nos últimos cinco anos. O programa solta cerca de 150 mil indivíduos de *R. quelen* por ano no rio Paraná e também fornece, em parceria com as prefeituras das

idades do Paraná, cerca de um milhão e oitocentos mil alevinos, dentre eles, *R. quelen*.

O mesmo tipo de problema ocorre nos tanques da COPEL em Salto Segredo Paraná. Durante a coleta dos peixes, foi observado que as espécies *R. branneri* e *R. voulezi* são mantidas nos mesmos tanques e os funcionários não souberam distinguir as espécies. Além disso, verificou-se que não foi realizado monitoramento da diversidade genética dessas espécies.

## 2.5. Eletroforese de isoenzimas

A técnica de eletroforese de isoenzimas tem sido utilizada no estudo de diversos tipos de organismos, entre eles os peixes. Tem sido usada como ajuda para a taxonomia e sistemática, permitindo estimar os níveis de variabilidade genética e o fluxo gênico em populações naturais, contribuindo, assim, para um melhor entendimento da biodiversidade e preservação das espécies.

O termo *eletroforese* foi criado em 1909, por Michaelis, quando descreveu a migração de colóides sob a influência de um campo elétrico (Sargent e George, 1975). Portanto, eletroforese é a migração de íons submetidos à corrente elétrica, com moléculas com carga positiva migrando para pólo negativo e moléculas com carga negativa migrando para o pólo positivo (Alfenas, 2006).

As isoenzimas foram definidas por Market e Moller (1959) como formas múltiplas de uma mesma enzima que ocorrem em um mesmo organismo com afinidade sobre um mesmo substrato.

A explicação do princípio básico de variação para os polimorfismos de isoenzimas é simples: as proteínas são cadeias de aminoácidos que refletem a expressão de um gene ativo no DNA (Torres et al., 2004).

A eletroforese visa à separação de moléculas em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações, em suportes porosos e tampões apropriados, sob a influência de um campo elétrico contínuo (Alfenas, 2006). Estes suportes porosos são os géis que funcionam como um meio por onde as isoenzimas precisam passar, podendo ser de amido hidrolisado (Smithies, 1955), acetato de celulose ou de poliacrilamida. Posteriormente, enzimas escolhidas ou

outras proteínas são coradas por soluções específicas em métodos histoquímicos (Hunter e Markert, 1957; Shaw e Prasad, 1970; Harris e Hopkinson, 1978; Richardson et al., 1986).

É importante conhecer os quatro níveis de estrutura protéica: primária, secundária, terciária e quaternária, a fim de compreender a origem dos padrões de bandas evidenciados como produto da eletroforese de isoenzimas. Essa estruturação é fundamental para o funcionamento das enzimas, pois proporciona o surgimento de cavidades denominadas “sítios ativos”, nos quais se ligarão substratos específicos para efetuar reações pertinentes ao funcionamento do organismo (Alfenas, 2006).

Se uma substituição de um aminoácido ocorrer numa molécula de proteína, pode ocorrer alteração de sua carga elétrica ou causar mudanças na sua conformação, além de alterar a taxa de migração. Algumas das mutações em regiões do DNA que codificam uma determinada enzima se expressarão como moléculas de enzima, diferindo em sua mobilidade eletroforética (Shields et al., 1983; Thorpe e Solé-Cava, 1994). Pode ocorrer também a subestimativa da variabilidade genética, uma vez que nem toda mutação do DNA altera a estrutura protéica correspondente e nem toda substituição de aminoácidos altera a mobilidade eletroforética da enzima (Torres et al., 2004).

Estudos bioquímicos usando eletroforese de proteínas possuem a vantagem de a molécula ter origem genética conhecida. Normalmente, é controlada por alelos ou por genes situados em diferentes *loci* e em quase todos os casos a estrutura molecular é determinada e provavelmente livre de modificações ambientais. Portanto, entre populações relacionadas ou espécies, as diferenças na estrutura de proteínas provavelmente são genéticas (Thorpe e Solé-Cava, 1994). Porém, quando as isoenzimas são controladas por alelos de um só *locus*, estas passam a ser denominadas de aloenzimas ou alozimas. (Gottlieb, 1971).

Uma outra vantagem da técnica é de que as isoenzimas são quase invariavelmente codominantes. Isto significa que os heterozigotos têm fenótipos diferentes dos homozigotos (Richardson et al., 1986; Murphy et al., 1996), podendo, assim, ser feita a discriminação dos indivíduos. A identificação dos homozigotos e heterozigotos torna o cálculo das freqüências gênicas muito simples

e essas podem ser utilizadas para comparação das populações (Thorpe e Solé-Cava, 1994; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O método é eficaz porque permite analisar um grande número de indivíduos. As condições de voltagem aplicadas ao gel e o tempo de corrida variam de acordo com o tampão utilizado e a quantidade de amostra deve ser suficiente para que a reação enzima/substrato possa ser detectada por técnicas citoquímicas (Torres et al., 2004).

As variações protéicas são de grande importância nos estudos genéticos como indicadores dos níveis de polimorfismo e relacionamento filogenético, bem como na identificação de raças, espécies e populações, representando, desse modo, uma valiosa ferramenta para estudos evolutivos e taxonômicos. Além disso, a diversidade alélica varia grandemente de *loci* para *loci*, sendo grande a variabilidade isoenzimática em organismos diplóides (Kesseli e Michelmore, 1986; Falcão e Contel, 1991). Cavalli-Molina (1984) destaca que numerosos estudos de *loci* enzimáticos mostram a existência de níveis significativos da variação gênica intra e interpopulacional em uma mesma espécie, além de uma diferenciação considerável entre espécies no grau de heterogeneidade isoenzimática intrapopulacional.

Desse modo, o papel das isoenzimas como marcadores genéticos possui valor indiscutível para as diversas áreas básicas de pesquisa genética e apresentam potencial enorme para serem utilizadas juntamente com marcadores moleculares (Clegg et al., 1990), monitorando o mapeamento de características quantitativas (Tanksley e Orton, 1983).

## **2.6. Eletroforese em gel de amido**

Para o estudo com isoenzimas, é preciso escolher o tipo de gel a ser utilizado, que pode ser natural ou sintético. Os géis naturais são de natureza química bem variada: proteínas, como gelatina e caseína; e polissacarídeos, como amido, ágar e pectina. Já um exemplo de gel sintético é a poliacrilamida (Alfenas, 2006).

A eletroforese em gel de amido foi primeiramente introduzida por Smithies (1955), estudando soroproteínas humanas. Seu poder de resolução, até hoje, só foi superado por gel de poliacrilamida.

Na eletroforese, a água se difunde em géis pela população de macromoléculas, rendendo porosidade uniforme do gel, o que garante sua morfologia. Os géis apresentam o fenômeno da desidratação, encolhendo, porém, mantendo sua morfologia. Por esse motivo, géis apropriados para a eletroforese não se conservam bem por muitos dias.

A porosidade do gel de amido varia conforme sua origem e seu preparo, bem ao contrário dos géis sintéticos, que se polimerizam (Alfenas, 2006).

Sob aquecimento, a suspensão aquosa de amido torna-se viscosa. Sua viscosidade aumenta acentuadamente a 65° C, ponto em que os grânulos de amido se desfazem. A partir daqui, à medida que a temperatura aumenta, a viscosidade diminui abruptamente, atingindo um valor mínimo e uniforme a 95°C. Nesse ponto, a suspensão deve ser desgaseificada e despejada em molduras próprias (geralmente de vidro).

Após o resfriamento, a suspensão geleifica-se, formando uma rede tridimensional de polímeros de glicose com ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6, originárias da amilopectina. Quando frio, o gel está preparado para receber o extrato protéico e ser submetido à eletroforese. A concentração do gel define sua consistência e porosidade. Na eletroforese em gel de amido, as moléculas, ao migrarem entre as malhas do gel, estão sujeitas aos efeitos de fricção e peneiramento molecular, proporcionando fracionamento das amostras (Sargent e George, 1975).

A eletroforese em gel de amido é menos onerosa do que a em gel de poliacrilamida, sendo este um dos principais motivos da ampla utilização do método. Visando reduzir ainda mais os custos da análise eletroforética em gel de amido no Brasil, Val et al. (1981), ao adaptarem o método de hidrólise descrito por Smithies (1955), obtiveram amido de milho de qualidade similar à do amido hidrolisado importado. Esses autores têm utilizado o amido assim preparado para eletroforese de várias enzimas de peixes (Alfenas, 2006). Mais recentemente, outros pesquisadores têm empregado no Brasil, penetrose de milho 13% como meio suporte para análise de isoenzimas. A penetrose de milho é produto relativamente barato e oferece resultados compatíveis com os de amido de batata hidrolisado disponível no mercado (Mori, 1993).

## 2.7. Eletroforese de isoenzimas e suas aplicações

Para um melhor entendimento da biodiversidade brasileira, projetos governamentais são elaborados no intuito de conhecer melhor a diversidade genética dos animais, realizando pesquisas para o conhecimento da composição e funcionamento dos ecossistemas, como é o caso do projeto PELD (Pesquisas Ecológicas de Longa Duração), no qual um dos objetivos é o monitoramento e a conservação da diversidade genética das espécies animais, onde alguns trabalhos sobre a variabilidade genética de peixes já foram desenvolvidos com curimba (*Prochilodus lineatus*), (Revaldaves e Renesto, 1997; Lopes, et. al., 2008), *Hoplias malabaricus* (Peres et al., 2002), cascudos (*Hypostomus*) (Zawadzki, et al, 2005), *Leporinus lacustris* (Peres e Renesto, 2005), *Loricariichthys platymetopon*, *Parauchenipterus galeatus*, *Pimelodus maculatus*, *Rhaphiodon vulpinus*, *Roeboides paranensis* e *Serrasalmus marginatus* (Lassala e Renesto, 2007). Outros trabalhos não pertencentes ao PELD também se referem à eletroforese de isoenzimas, *Rineloricaria pentamaculata* (Limeira et al., 2009) e *Neoplecostomus yapo* (Philippsen et al., 2009).

Segundo Renesto e Peres (2003), estudos de genética de populações procuram entender como as variações na taxa de sobrevivência, reprodução e crescimento contribuem para alterações nas frequências gênicas e genótípicas das populações e se estas alterações conferem maior valor adaptativo às espécies. No entanto, o polimorfismo bioquímico está altamente relacionado ao tipo de ambiente e ao tamanho da população, ou seja, quanto maior a população maior o polimorfismo e menor a chance a extinção terá.

Para estimar a variabilidade genética de uma população de *Leporinus lacustris*, Peres e Renesto (2005) identificaram trinta *loci* em dezesseis sistemas enzimáticos analisados, sendo que os resultados mostraram baixa heterozigosidade da população estudada.

Renesto e Peres (2003) avaliaram a variabilidade genética em *Hoplias aff. Malabaricus* em duas localidades do alto rio Paraná por eletroforese de gel de amido. Seus resultados mostram alta variabilidade genética dessa espécie quando comparadas com outras espécies da bacia do rio Paraná.

Para estimar relação entre variabilidade genética e estratégias reprodutivas de nove espécies de peixes do alto rio Paraná, Lassala e Renesto (2007) se basearam na análise de 36 *loci* isoenzimáticos em eletforese de gel de amido.

Sodré e Almeida (1998) utilizaram a análise de seis sistemas isoenzimáticos de fígado, músculo e coração para avaliar a variabilidade genética em três espécies de Pimelodidae (Siluriformes) do rio Tibagi.

Uma análise da variação de aloenzimas em 32 *loci* de *Acanthopagrus butcheri* e *Acanthopagrus australis* ao sul da Austrália (Farrington e Augustin, 2000), objetivando avaliar as implicações de manejo, pesca recreativa e a relação entre essas espécies, revelou valores de H igual a 0,035 e 0,065, respectivamente, e polimorfismo ( $P_{0,95}$ ) igual a 0,067 e 0,200, respectivamente. Esses dados genéticos confirmaram uma alta similaridade genética entre as duas espécies.

Correia et al. (2007), por meio do estudo de isoenzimas, analisou a variabilidade genética da espécie *Cyphocharax voga* (Hensel, 1869), demonstrando variação genética entre os indivíduos analisados.

Utilizando métodos eletroforéticos, foi possível avaliar a expressão da enzima L-lactato: NAD<sup>+</sup>óxido-redutase (LDH, EC. 1.1.1.27), durante o desenvolvimento embrionário de *Betta splendens*, na Colômbia, desde oócito fertilizado até a fase de nêurula (Maestre-Serrano et al., 2008).

Quatro populações de *Neoplecostomus yapo* foram analisadas por meio de eletforese de isoenzimas por Philippsen et al. (2009). Seus resultados revelaram que populações de dois rios, Verde e Fortaleza (Bacia do Paranapanema), apresentavam valores de heterozigosidade inferiores às médias esperadas para peixes. Por meio da análise dessas enzimas, os autores também observaram que as quatro populações são geneticamente semelhantes entre si.

No trabalho de Ruiz-Carus e Uribe-Alcocer (2003), foram utilizados marcadores isoenzimáticos associados a análise de DNA mitocondrial para avaliar a filogênia de três espécie de peixes da mesma família: *Eucinostomus gula*, *Eugerres plumieri* e *Diapterus auratus*.

A técnica não se restringe a peixes de água doce. Ela tem sido aplicada para estudos em peixes marinhos. Solé-Cava et al. (1983) avaliou, utilizando

marcadores isoenzimáticos a heterozigosidade entre populações de *Squatina*, no sul do Brasil, e também o nível de identidade genética entre eles.

Com objetivo de avaliar a estruturação genética de duas espécies de peixes recifais, Freitas et al. (2003) fizeram uso de eletroforese de isoenzimas. Seus resultados indicaram a presença de estoques pesqueiros diferenciados entre duas populações de uma das espécies avaliadas: *Acanthurus chirurgus*.

Por meio de eletroforese de isoenzimas em gel de amido, Sandoval-Catellanos et al. (2005) examinaram a diferenciação e a variabilidade genética de populações de três espécies robalos, *Centropomus viridis*, *C. medius*, *C. robalito*, de diversas localidades do litoral do Pacífico mexicano. Os resultados mostraram que a heterozigosidade total é semelhante nas três espécies e ainda foram encontrados valores significativos de divergência populacional.

Astorga e Galleguillos (1998) estimaram a divergência genética entre duas espécies do gênero *Trachurus* do nordeste e sudeste do Pacífico, a espécie encontrada no mar do Japão, *T. japonicus* e a espécie *T. symmetricus murphyi*, encontrada no Chile. Foram analisadas 15 isoenzimas com 24 *loci* e destes cinco mostraram diferenças entre as duas espécies.

Um estudo comparativo da purificação da lactato desidrogenase (L-lactato NAD<sup>+</sup> oxidoreductase, E.C.1.1.1.27) do músculo epaxial do peixe *Prochilodus scropha* e do peixe antártico *Notothenia neglecta* foi feito por Carvalho et al. (1998). Este trabalho verificou a presença de formas múltiplas da enzima que determinam o seu padrão isoenzimático.

A eletroforese de isoenzimas também é uma ferramenta no estudo de variabilidade genética em populações de plantas, especialmente cultivares. No trabalho de Anti (2000), foram estudadas isoenzimas de sementes de duas cultivares de soja. O trabalho contribuiu para mostrar que as duas cultivares de soja, embora tenha um parental em comum, apresentaram diferenças nos perfis eletroforéticos em quatro isoenzimas.

Rossiter et al. (2008) com o objetivo de encontrar genótipos de aceroleira, resistentes e tolerantes a *Meloidogyne incógnita* raça 2, utilizaram marcadores isoenzimáticos para indicar plantas destinadas a porta-enxerto.

Deste modo, marcadores isoenzimáticos são instrumentos confiáveis para avaliar níveis de variabilidade genética em populações.

## **2.8. Variabilidade genética de populações naturais**

Segundo Solé-Cava (2001), o termo diversidade biológica ou biodiversidade compreende, desde a sua origem, a diversidade ecológica e a diversidade genética. A diversidade genética pode ser chamada também de variabilidade genética e pode ser entendida como a diversidade de alelos nos vários *loci* de uma determinada espécie (Solé-Cava, 2001). O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução da espécie (Allcock et al., 1995). Em populações de indivíduos multicelulares, as variações garantem a adaptação ao meio, caso este passe por mudanças (Mettler e Gregg, 1973). Podem, ainda, serem usadas como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversos ramos, como, por exemplo, para verificar afinidades e limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e detectar restos de animais, como conteúdos estomacais e produtos industrializados de animais ameaçados de extinção (Avice, 1994).

Populações naturais normalmente têm altos níveis de variação genética (Nevo, 1978; Solé-Cava e Thorpe, 1991). Essa variação é introduzida continuamente nas populações por mutação ou migração de indivíduos de outras populações e é perdida por deriva genética, por endocruzamento e, no caso de genes não neutros, pela maior parte dos tipos de seleção natural (Nei, 1987). Em populações ameaçadas de extinção ou que saíram de um processo de extinção, a perda da variabilidade é um dos principais problemas (Solé-Cava, 2001). Entre diferentes populações, observa-se um alto grau de diversidade genética, devido principalmente ao isolamento geográfico entre elas (Avice, 1975). E conforme Futuyma (2002), quanto mais distantes geograficamente estão estas populações, maior será a distância genética entre elas.

Em geral, populações alopátricas da mesma espécie tendem a ter pequenas diferenças de frequência alélicas em alguns *loci*. Espécies do mesmo gênero são freqüentemente idênticas em alguns *loci*, mas completamente diferentes em outros e têm alguns *loci* com sobreposição de frequências gênicas. Entre espécies de gêneros diferentes, a maioria dos *loci* é inteiramente diferente, isto é, fixadas para diferentes alelos, mas alguns podem ser idênticos (Thorpe e Solé-Cava, 1994). E em populações simpátricas, a divergência significativa das frequências alélicas em um único *locus* pode evidenciar um isolamento reprodutivo. Logo, estas populações podem ser consideradas de espécies diferentes. Quando isso acontece, este *locus* é considerado diagnóstico que, para Ayala (1983), é aquele que permite a qualquer indivíduo, com base no genótipo daquele *locus*, ser atribuído a um ou a outro conjunto gênico, ou seja, espécies, com uma probabilidade de 99% ou 99,9%.

Se populações alopátricas de *status* incerto têm identidades genéticas de Nei (1972) abaixo de 0,85, é improvável que elas deveriam ser consideradas da mesma espécie, enquanto espécies diferentes geralmente possuem valores de identidade abaixo de 0,35. Quando os valores de identidade flutuam entre 0,35 e 0,85, é muito provável que sejam populações formadas por espécies do mesmo gênero, mas não da mesma espécie (Thorpe e Solé-Cava, 1994).

Para medir a variação genética de uma população, dois parâmetros são bastante utilizados. O primeiro é a heterozigosidade observada ( $H_o$ ), que é a porcentagem de heterozigotos para um determinado *locus* gênico. O outro é a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) ou em equilíbrio, que é a proporção de heterozigotos que deveria haver se a população estivesse em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Solé-Cava, 2001).

Geralmente, invertebrados apresentam maiores níveis de polimorfismo do que os vertebrados (Futuyma, 2002; Ward et al., 1992). Dentre os vertebrados mamíferos, aves e répteis possuem heterozigosidades semelhantes, enquanto anfíbios possuem os maiores níveis de heterozigosidade entre os vertebrados. Os peixes formam a classe de vertebrados com menor heterozigosidade (Ward et al., 1992), embora apresentem em muitos casos diferenças morfológicas, não apresentam a correspondente variação isoenzimática (Avice, 1975).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Locais de coleta

Um dos locais de coleta constou dos tanques do CPAA (Centro de Pesquisa de Aqüicultura e Ambiente) do IAP (Figura 1) na cidade de Toledo-Paraná. A espécie coletada foi *R. quelen*, endêmica da Bacia do Rio Paraná.

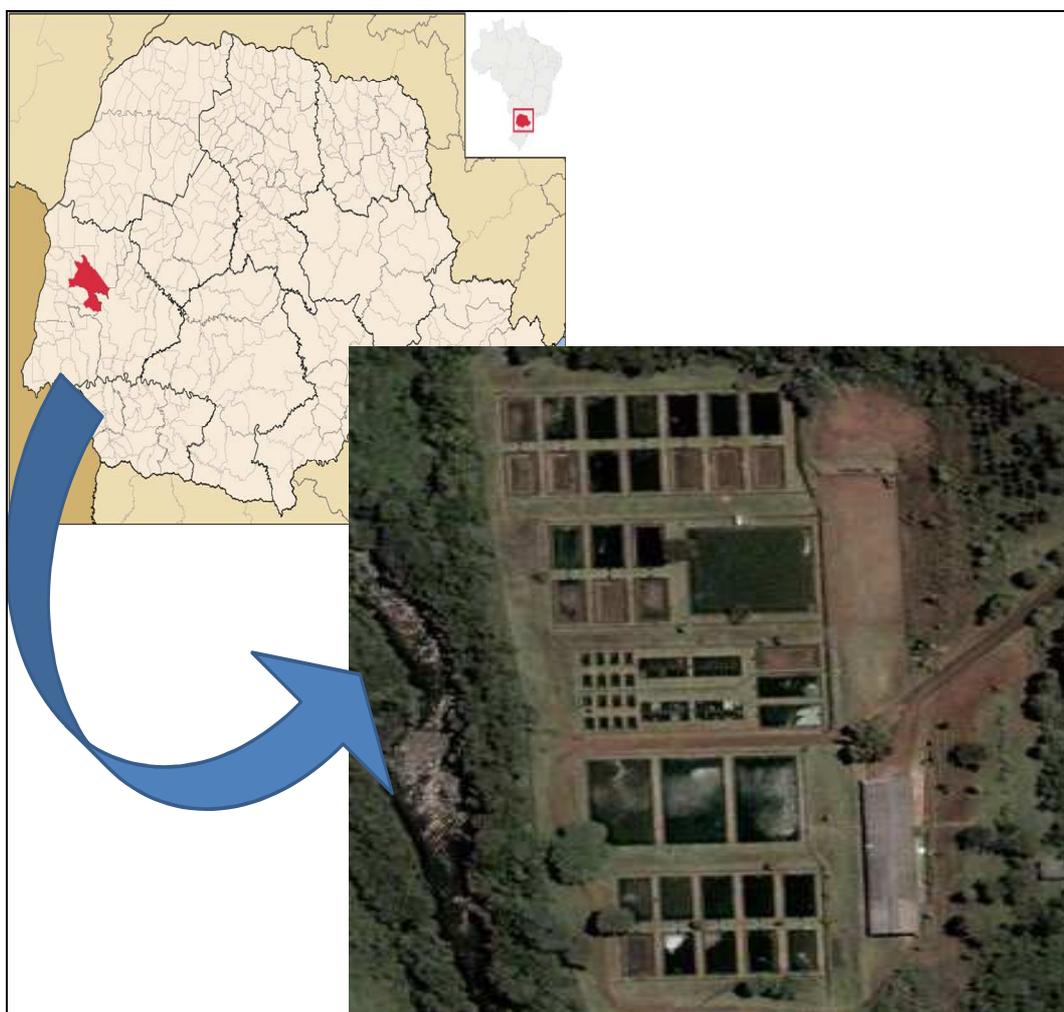


Figura 1 - Tanques de piscicultura do Centro de Pesquisa de Aqüicultura Ambiental- IAP- Toledo.

As espécies *R. branneri* e *R. voulezi* foram coletadas nos tanques da Estação Experimental de Estudos Ictiológicos, Usina Ney Braga (Salto Segredo), Companhia de Energia do Paraná - COPEL Geração; Mangueirinha, PR (Figura 2):



Figura 2 - Tanques de piscicultura (à direita) da COPEL na Usina Hidrelétrica Salto Segredo (à direita).

### 3.2. Caracterização das amostras

As coletas foram realizadas no período de dezembro de 2007 a março de 2009. Foram coletados 35 indivíduos de *Rhamdia quelen* (Figura 3) na estação de piscicultura do IAP em Toledo-CPAA .

A outra coleta foi feita na unidade da Estação Experimental de Estudos Ictiológicos, Usina Ney Braga (Segredo), Mangueirinha, PR (Figura 2). Ali, foram coletados 35 indivíduos de *Rhamdia branneri* e 31 de *Rhamdia voulezi*.

Todas as amostras foram levadas para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Paranaense- UNIPAR- Campus Toledo. Os peixes foram trazidos ainda vivos e só então retirados os tecidos: fígado, brânquias, músculo, coração e armazenados em super- freezer a  $-76^{\circ}$ . Para separar as espécies *R.branneri* das *R. voulezi*, que estavam juntas nos tanques de piscicultura, foi utilizada a observação da característica morfológica das nadadeiras dorsais, que diferem entre essas duas espécies.

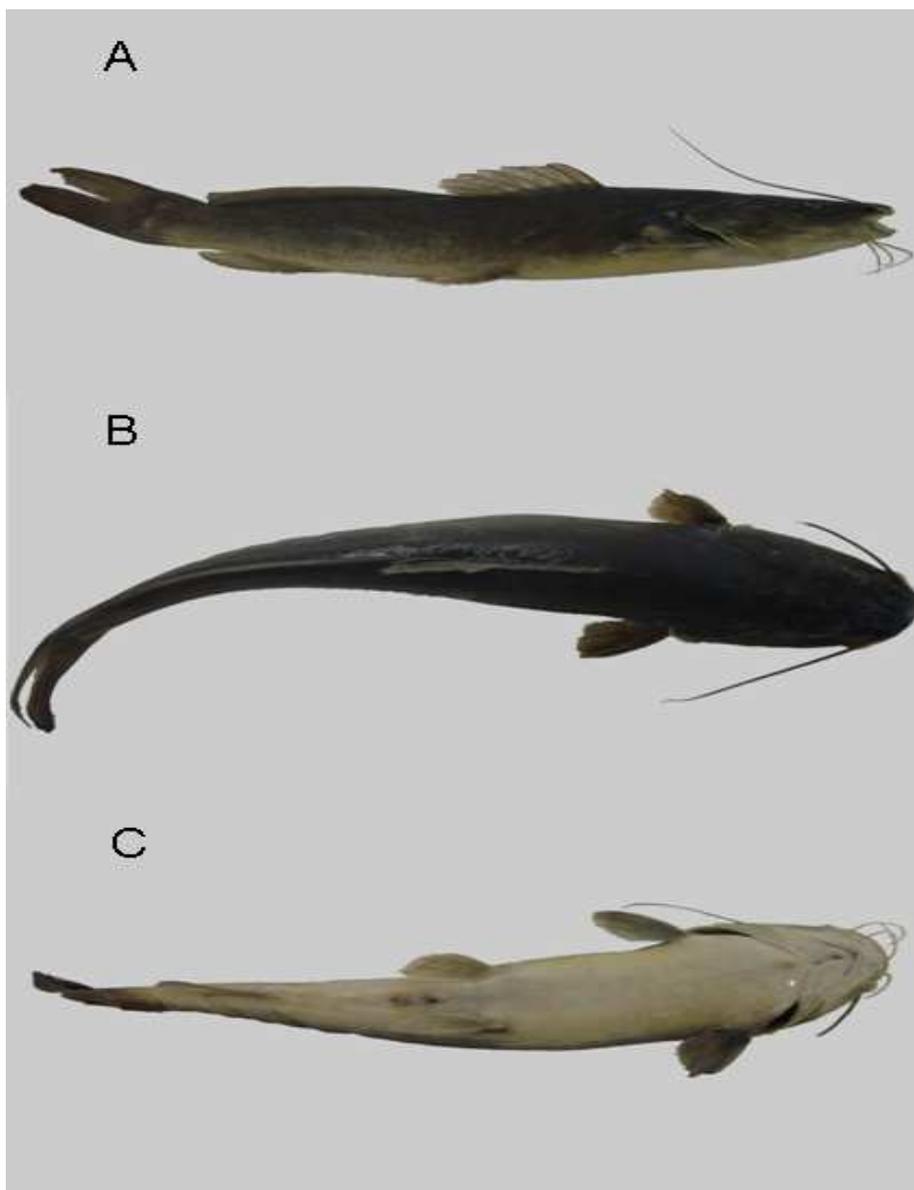


Figura 3 - **A:** Foto de um exemplar de *Rhamdia quelen*, capturado nos tanques do Centro de Pesquisa Aqüicultura e Ambiente- Toledo; comprimento padrão: 350mm; comprimento total: 410mm. **B:** Foto lateral de um exemplar de *Rhamdia quelen*, capturado nos tanques do Centro de Pesquisa Aqüicultura e Ambiente- Toledo; comprimento padrão: 350mm; comprimento total: 410mm. **C:** Foto da região ventral de um exemplar de *Rhamdia quelen*, capturado nos tanques do Centro de Pesquisa Aqüicultura e Ambiente- Toledo; comprimento padrão: 350mm; comprimento total: 410mm.

### **3.3. Análise da variação tecidual das enzimas feitas em exemplar de *R. quelen***

Tecidos do estômago, baço, olhos, brânquias, músculo branco, fígado, coração e rim foram removidos de um indivíduo, para análise da expressão tecidual

de cada enzima. A metodologia para essa análise seguiu o mesmo protocolo descrito abaixo.

### **3.4. Eletroforese em gel de amido**

Os indivíduos foram coletados e trazidos ainda vivos em sacos plásticos com água e oxigenados ao laboratório de Biotecnologia da Universidade Paranaense-UNIPAR- Toledo onde amostras de músculo branco, fígado, coração e brânquias foram devidamente extraídas, etiquetadas, armazenadas e congeladas em Super Freezer a  $-76^{\circ}$  C. Para controle das amostras, elas foram etiquetadas conforme as espécies.

Os géis de amido foram preparados com amido de milho (Penetrose<sup>®</sup>) 15%, sobre placa de vidro horizontal, utilizando dois sistemas tampão distintos: Tris-Borato-EDTA (TBE), pH 8,6 (Boyer et al., 1963), Tris-Citrato (TC), pH 7,0 (Shaw e Prasad, 1970). Cada um deles é específico para os diferentes sistemas isoenzimáticos e tecidos utilizados (Quadro 1). Os géis foram preparados extraíndo-se 15 mililitros de tampão, que foram fervidos com o amido de milho em frascos tipo “Erlenmeyer”. Após a fervura o gel foi despejado em placa de vidro horizontal, previamente aquecida. Quando atingiram a temperatura ambiente, os géis foram colocados sob refrigeração por aproximadamente 24 horas. Somente após esse tempo é que foram utilizados para a corrida eletroforética. Após o resfriamento, a solução fica com consistência de gel de 0,6 cm de espessura.

As amostras dos tecidos foram maceradas com bastão de vidro em microtubos de propileno (1,5 ml) com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5. Devido à presença de grande quantidade de gordura no fígado, para a sua precipitação, foi adicionado tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Pasteur et al., 1988) na proporção de 1:2 (tecido:CCl<sub>4</sub>). Os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm (26442 x g), com temperatura entre  $1^{\circ}$  C a  $5^{\circ}$  C durante 30 minutos. O extrato protéico (sobrenadante) foi aplicado no gel de amido com pequenas tiras de papel-filtro (4 mm x 8 mm) Whatman 3MM<sup>®</sup> embebidas no sobrenadante das amostras. Em seguida, foi submetido à eletroforese horizontal contínua, sob refrigeração, com

duração de 17 horas para as corridas noturnas. A corrente elétrica nos géis, medido através de suas extremidades com um multímetro, foi de aproximadamente 40V para as noturnas. Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado horizontalmente em duas partes, as quais foram incubadas com soluções histoquímicas específicas, necessárias para a revelação das bandas de atividade enzimática de cada sistema, preparadas segundo protocolo de Murphy et al. (1996).

Foram analisados 11 sistemas enzimáticos, permitindo a obtenção de fenótipos codificados por vários loci. Os *loci* e alelos foram denominados conforme Murphy et al. (1996). Os dados foram analisados pelo programa Popgene 3.1 (Yeh, 1999).

### 3.5. Análise dos dados

Para o presente trabalho, foram analisados onze sistemas enzimáticos em gel de amido descritos no Quadro 1. A nomenclatura das enzimas utilizadas foi sugerida por Murphy et al. (1996).

Quadro 1 - Enzima, número de comissão (E.C.n°), tecido, tampão e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido. (B = brânquia; F = fígado; M = músculo; TBE = Tris-borato-EDTA; TC = Tris-citrato; TEM = Tris-EDTA-maleato; Mo = Monomérica; D = Dimérica; T = Tetramérica)

Enzima (abreviação)	E.C n°	Tecido	Tampões	E. Q.
Álcool desidrogenase (ADH)	1.1.1.1	B/F	TBE	D
Aspartato aminotransferase (AAT)	2.6.1.1	F	TEB	D
Enzima Málica (ME)	1.1.1.40	F	TC	T
Esterase (EST)	3.1.1.1	B/F	TBE	Mo
Fosfoglucomutase (PGM)	5.4.2.2	M	TC	Mo
Glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH)	1.1.1.8	M	TC	D
Glicose desidrogenase (GCDH)	1.1.1.118	F	TEB	D
Isocitrato desidrogenase (IDH)	1.1.1.42	B/F/M	TC	D
L-Lactato desidrogenase (LDH)	1.1.1.27	M	TC	T
Malato desidrogenase (MDH)	1.1.1.37	F	TC	D
Peroxidase (PER)	1.11.1.6	F	TBE	T

A variabilidade genética foi estimada pelo cálculo da heterozigosidade ( $H_e$  e  $H_o$ ) de acordo com Nei (1978). A homogeneidade das frequências alélicas entre as populações foi verificada por meio de teste de  $\chi^2$  de contingência. Também

foram calculadas a identidade (I) e a distância (D) genética de Nei (1978), por meio dos valores de frequência alélica.

Os géis foram interpretados de acordo com a estrutura quartenária das enzimas segundo Ward et al. (1992).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de eletroforese de 11 sistemas das três espécies analisadas detectou 19 *loci* em 30 exemplares de *Rhamdia quelen*, 30 de *R. branneri* e 30 de *R. voulezi*. Os *loci* analisados foram: Aspartato amino transferase (Aat-1, Aat-2), Álcool Desidrogenase (Adh), Esterase (Est-1), Glicose desidrogenase (Gdh), Glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3p-1, G3p-2), Isocitrato desidrogenase (Idh-1, Idh-2), Lactato desidrogenase (Ldh-1, Ldh-2), Malato desidrogenase (Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3), Enzima Málica (Me-1, Me-2), Peroxidase (Per-1, Per-2), Fosfoglicomutase (Pgm).

Os géis de GPI, SOD e SORB não apresentaram padrão interpretável para serem inseridos na análise dos resultados finais deste estudo.

O Quadro 3 apresenta os *loci* polimórficos de cada espécie e os respectivos *loci* que estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Quadro 3 - Demonstração dos *loci* polimórficos em cada espécie analisada e os *loci* que estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg

	<i>R. quelen</i>	<i>R. branneri</i>	<i>R. voulezi</i>
<i>Loc</i> i polimórficos	Aat-1, Adh, Est, Gdh, G3p-2, Idh-1, Idh-2, Ldh-A, Mdh-A, Me-1, Me-2, Per-2, Pgm	Aat-1, Adh, Est, Gdh, G3p-2, Idh-1, Ldh-1, Mdh-A, Me-1, Me-2, Per-2, Pgm	Aat-1, Adh, Est, Gdh, G3p-2, Idh-1, Ldh-1, Mdh-A, Me-1, Me-2,
<i>Loc</i> i polimórficos em equilíbrio de Hardy-Weinberg	Est, Idh-2, Pgm	Aat-1	Aat-1, Idh-1
%	68,42%	63,15%	52,63%

O padrão de bandas dos *loci* variantes está evidenciado nas Figuras do apêndice.

A população de *R. quelen* apresenta o maior índice de *loci* polimórficos em relação às outras duas espécies, bem como *loci* polimórficos em equilíbrio de Hardy-Weinberg, como mostra o Quadro 3, e a espécie *R. branneri* apresentou somente um *locus* (Aat-1) em equilíbrio.

Um grande número de fatores pode levar uma população a não se encontrar em equilíbrio de Hardy-Weinberg para um determinado *locus*, como endocruzamento e seleção natural (Nei, 1987), além da possibilidade do número de exemplares coletados.

As espécies coletadas nos tanques são a progênie dos reprodutores que não se acasalaram ao acaso, como numa população natural. Desta forma, isso pode explicar o fato das espécies terem poucos *loci* em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Nos últimos anos, tem havido muita controvérsia sobre o uso de programas de repovoamento e o uso de incubadoras para gestão de recursos natural. Segundo Ryman e Laikre (1991), um ponto preocupante é em relação ao impacto genético sobre a população natural. Além desse fato, há ainda a possibilidade de perda da variabilidade genética intrapopulacional, decorrente da deriva genética, caso o tamanho efetivo da população em cativeiro seja pequeno.

Neste estudo, observa-se que a variabilidade genética das três espécies se mostra alta, apresentando mais de 60% dos *loci* polimórficos (Quadro 3). Esses resultados não são os esperados em espécies mantidas em cativeiro e revelam que provavelmente, os indivíduos provenientes do programa estejam refletindo a variabilidade das populações naturais.

Lidani et al. (2006), entretanto, ao caracterizar a variabilidade genética de exemplares de *Rhamdia* em cativeiro, obtiveram um alto índice de *loci* polimórficos. Dos 165 caracteres gerados por amplificação (RAPD), 155 foram polimórficos (93,9%). Os autores sugerem que este alto índice de polimorfismo pode ser devido ao manejo reprodutivo dos animais amostrados, baseado na mistura de ovócitos coletados de uma fêmea com o sêmen de vários machos, o que elevaria a variabilidade genética.

Neste trabalho, os valores de heterozigosidade obtidos e esperados se mostraram muito acima da média para peixes (0,05), conforme mostra Quadro 5. Levando em consideração os mesmos 11 sistemas enzimáticos analisados no presente trabalho, o valor de  $H_e$  para espécies de água doce seria de 0,051 (Ward et al., 1992). No entanto, os valores de  $H_e$  foram: 0,2246, para *R. quelen*; 0,2266 para

*R. branneri* e 0,1936 para *R. voulezi*. Sendo assim, as três espécies apresentam valores de  $H_e$  maiores que a média para peixes em geral.

Os testes de qui-quadrado de homogeneidade de frequências alélicas, que indicam se as frequências alélicas são diferentes entre as três espécies, mostram que elas diferem apenas em quatro *loci* (*Aat-1*, *Adh*, *Id-1* e *Mdh-1* e *Me-1*), ou seja, as três espécies são muito semelhantes geneticamente (Quadro 4).

Estudos de *loci* enzimáticos têm sido utilizados para verificação da existência de espécies de status taxonômico duvidoso ou espécies crípticas entre morfótipos simpátricos (Thorpe e Solé-Cava, 1994).

Utilizando-se cinco *loci* de microssatélites, Melo et al. (2006) caracterizou geneticamente 235 indivíduos de seis plantéis de tilápia da região Sudeste do Brasil. Os resultados destes autores sugerem ocorrência de perda de heterozigose nos plantéis analisados.

Zawadzki et al. (2004), estudando exemplares de *H. hermanni* e três morfótipos de *Hypostomus* coletados no ribeirão Keller, detectaram três *loci* diagnósticos para *Hypostomus* sp. 1 (*Gdh-A*, *G6pdh-A* e *G6pdh-B*), oito para *Hypostomus* sp. 2 (*sAta-B*, *G3pdh-A*, *G3pdh-B*, *Gpi-B*, *Ldh-A*, *Ldh-B*, *sMdh-B* e *sMdhp-A*) e um para *Hypostomus* sp. 3 (*sMdh-A*), permitindo, assim, a confirmação de três espécies distintas.

Em seu experimento para investigar as conseqüências genéticas da criação de Salmões do Atlântico em incubadoras, Crozier (1998) analisou, através de marcadores isoenzimáticos, cinco *loci* polimórficos já conhecidos anteriormente nas populações selvagens. Seus resultados foram obtidos em várias etapas do crescimento dos juvenis. Dados iniciais mostraram que todos os alelos registrados nos reprodutores estavam presentes na progênie. O número médio de alelos por *locus* (1,92) não diferiu entre as amostras colhidas dos indivíduos mantidos na incubadora, em comparação com as amostras em estado selvagem (1,95) (Mann-Whitney U-test,  $P > 0,9$ ). O autor ainda mostrou que os valores de heterozigosidade não diferiram entre os indivíduos da incubadora e os selvagens.

Outro trabalho com marcadores isoenzimáticos, realizado por Ferguson (1994) com o objetivo de avaliar duas espécies usadas em programas de

repopoamento pelo Ministério de Recursos Naturais de Ontário (Canadá), verificou que o manejo utilizado estava preservando a variabilidade genética das duas espécies mantidas em cativeiro, *Salmo trutta* e *Oncorhynchus mykiss* em relação a indivíduos nativos.

Was e Wenne (2002) avaliaram a diferenciação genética de *Salmo trutta*. Neste estudo foram analisados indivíduos mantidos em incubadoras e indivíduos presentes em seu habitat natural, ao sul do mar Báltico, por meio de análise de microssatélites. Seus resultados apontam que o nível de heterozigosidade foi comparável entre os indivíduos mantidos em incubadoras e os indivíduos do habitat natural que deram origem àqueles.

Quadro 4 - Frequências alélicas por *locus* em amostras de três espécies de *Rhamdia* provenientes de tanques de piscicultura. n = número de indivíduos amostrados;  $\chi^2$  = qui-quadrado de homogeneidade das frequências alélicas; números em negrito indicam os *loci* em equilíbrio de Hardy-Weinberg

<i>Locus</i>	Alelo	n	<i>R. quellen</i>	n	<i>R. branneri</i>	N	<i>R. voulezi</i>	$\chi^2$
<i>Aat-1</i>	<i>a</i>	34	0,4265	34	0,5588	27	0,2778	9,70*
	<i>b</i>		0,5735		0,4412		0,7222	
<i>Aat-2</i>	<i>a</i>	34	1,0000	34	1,0000	27	1,0000	0,00 ns
<i>Adh</i>	<i>a</i>	34	0,9706	34	0,9118	27	0,7778	12,20*
	<i>b</i>		0,0294		0,0882		0,2222	
<i>Est</i>	<i>a</i>	<b>27</b>	0,4259	26	0,5385	19	0,4474	5,64 ns
	<i>b</i>		0,5741		0,4231		0,5526	
	<i>c</i>				0,0385			
<i>Gdh</i>	<i>a</i>	26	0,8077	26	0,7308	19	0,7368	1,00 ns
	<i>b</i>		0,1923		0,2692		0,2632	
<i>G3p-1</i>	<i>a</i>	38	1,0000	38	1,0000	32	1,0000	0,00 ns
<i>G3p-2</i>	<i>a</i>	19	0,7105	23	0,6522	23	0,7609	3,33 ns
	<i>b</i>		0,1053		0,1304		0,1522	
	<i>c</i>		0,1842		0,2174		0,0870	
<i>Idh-1</i>	<i>a</i>	32	0,3750	29	0,2414	25	0,2000	12,68 ns
	<i>b</i>		0,5312		0,5862		0,6400	
	<i>c</i>		0,0781		0,0690		0,1400	
	<i>d</i>		0,0156		0,0517		0,0200	
	<i>e</i>				0,0517		0,0200	
<i>Idh-2</i>	<i>a</i>	31	0,9677	29	1,0000	24	1,0000	3,46 ns
	<i>b</i>		0,0323					
<i>Ldh-A</i>	<i>a</i>	36	0,7639	35	0,6857	31	0,7903	2,10 ns
	<i>b</i>		0,2361		0,3143		0,2097	
<i>Ldh-B</i>	<i>a</i>	37	1,0000	35	1,0000	31	1,0000	0,00 ns
<i>Mdh-A</i>	<i>a</i>	34	0,6912	30	0,8333	25	0,8800	7,05*

Quadro 4, cont.

	<i>b</i>		0,3088		0,1667		0,1200	
<i>Mdh-B</i>	<i>a</i>	37	1,0000	35	1,0000	31	1,0000	0,00 ns
<i>Mdh-C</i>	<i>a</i>	37	1,0000	35	1,0000	31	1,0000	0,00 ns
<i>Me-1</i>	<i>a</i>	36	0,6944	28	0,8571	24	0,9583	14,32***
	<i>b</i>		0,3056		0,1429		0,0417	
<i>Me-2</i>	<i>a</i>	33	0,5152	25	0,5800	21	0,6905	7,10 ns
	<i>b</i>		0,4545		0,3400		0,3095	
	<i>c</i>		0,0303		0,0800			
<i>Per-1</i>	<i>a</i>	34	1,0000	34	1,0000	27	1,0000	0,00 ns
<i>Per-2</i>	<i>a</i>	34	1,0000	34	0,9706	27	1,0000	3,62 ns
	<i>b</i>				0,0294			
<i>Pgm</i>	<i>a</i>	35	0,9857		1,0000	27	1,0000	1,75 ns
	<i>b</i>		0,0143					

Teste qui-quadrado \* =  $P < 0,05$ , \*\*\* =  $P < 0,001$ ; ns = não significante.

Os índices de fixação para cada espécie mostram, em média, um excesso de homozigotos e um excesso de heterozigotos observado apenas nos *loci Idh-2* e *Me-2* de *R. quelen* e *R. branneri* (Quadro 6).

Quadro 5 - Resultados obtidos:  $H_o$  = heterozigosidade observada;  $H_e$  = heterozigosidade esperada; DP = desvio padrão; P = proporção de *loci* polimórficos;  $N_a$  = número médio de alelos por *locus*; F = índice de fixação médio para todos os *loci*

	<i>R. quelen</i>	<i>R. branneri</i>	<i>R. voulezi</i>
$H_o$	0,0879	0,0908	0,1003
DP	0,1481	0,1633	0,1807
$H_e$	0,2246	0,2266	0,1936
DP	0,2342	0,2388	0,2116
P	63,16%	57,89%	52,63%
$N_a$	1,8421	1,8947	1,6842
F	0,6086	0,5993	0,4819

O índice  $F_{IS}$  de Sewall Wright mostra que na média das três espécies há um excesso (49,6%) de homozigotos em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Quadro 6). Esses resultados se opõem ao esperado, pois demonstram uma alta variabilidade genética nas três espécies, porém, um excesso de indivíduos homozigotos. Endogamia pode ser sugerida como explicação para este evento, caso os progenitores estejam sendo mantidos há muito tempo nos tanques de piscicultura

e juvenis fortes, descendentes destes, serem selecionados para fazerem parte do plantel de matrizes.

Uma importante consideração deve ser feita na escolha das matrizes que são utilizados em programas de repovoamento ou reintrodução de espécies nativas (Cross, 2000). Há o perigo de utilizar próprios indivíduos descendentes do tanque de matrizes. Mesmo uma geração de desova pode causar uma mudança na composição genética em nível de variabilidade genética. A fim de evitar esse erro é importante recolher reprodutores aleatoriamente em número suficiente para evitar efeitos de endogamia (pelo menos 50 indivíduos de cada sexo), todos esses indivíduos devem participar de desova e pré-acasalamento.

Segundo Cross (2000) em tanques de piscicultura, cujo objetivo é a reintrodução de espécies nativas, o uso da genética deve ser o de maximizar a eficácia do programa de repovoamento e minimizar quaisquer efeitos negativos genéticos para as populações nativas.

A criação de peixes nativos em cativeiro com finalidade de repovoamento deve conter medidas na escolha dos fundadores (Philipart, 1995). Segundo o autor, estes devem conter o máximo de diversidade genética com a finalidade de manter a variabilidade genética durante o período de reprodução em cativeiro. Isso reduz fenômenos de deriva genética, endogamia e seleção involuntária de genótipos não adaptáveis ao habitat natural.

Allendorf e Phelps (1980) detectaram redução significativa da variação genética em *locus* isoenzimáticos em *Salmo clarki* mantidos em estoque por 14 anos. Os autores mostraram uma redução de 57% na proporção de *loci* polimórficos em relação à população selvagem e uma redução de 21% nos valores de heterozigidade. Esta perda de variação foi atribuída a um número limitado de fundadores da unidade de incubação e efeitos da deriva genética na manutenção do estoque de incubação. Os valores de variabilidade apresentados neste trabalho e os valores de heterozigidade, no entanto, mostram que as três populações de *Rhamdia* ainda não evidenciaram os prejuízos decorrentes do manejo.

Espécies cultivadas de *Haliotis midae* (África do sul) e *Haliotis rubra* (Austrália) foram investigadas através de marcadores microssatélites por Evans et

al. (2004). Todas as populações analisadas apresentaram perda na variabilidade genética, porém não houve perda de heterozigosidade associadas.

Três populações do linguado japonês, *Paralichthys olivaceus*, totalizando 150 indivíduos, foram analisados por Liu et al. (2006) por meio de IRSS (Inter-Repeat Sequência Simples). Nas três populações estudadas, 33,92%, 28,15% e 27,45% dos *locus* foram polimórficos entre todos os genótipos testados. Dados inferiores aos encontrados para as três populações de *Rhamdia* foram obtidas por aqueles autores. A heterozigosidade média das três populações também se mostrou alta em relação ao esperado.

Ayllon et al. (2006), utilizando microssatélites e marcadores isoenzimáticos, estudaram a estrutura e dinâmica da truta *Salmo trutta* que foi fortemente afetada pela construção de uma barragem, reduzindo a área para desova. Além disso, programas de repovoamento falharam e a população parece mantida por indivíduos adultos anádromos, de populações de dois rios vizinhos. Seus resultados não apresentaram diferenças significativas nas frequências alélicas entre os indivíduos residentes e os migratórios. O valor de heterozigosidade esperada e observada foi baixa nos indivíduos do rio Navia (Espanha) que sofreu a fragmentação.

Os autores encontraram uma alta variabilidade genética nos cinco *locus* de microssatélites em todos os indivíduos analisados. Na falha do programa de repovoamento, as diferenças genéticas têm sido mantidas pelos indivíduos migratórios dos rios vizinhos.

Os valores de identidade genética ( $F_{IS}$ ) indicam que elas são muito semelhantes geneticamente (Quadro 6) sugerindo um apoio à hipótese (Silfvergrip, 1996) de que as três são da mesma espécie (valores de identidade genética entre espécies devem ser menores que 0,85 de acordo com o critério de Thorpe e Solé-Cava, 1994).

A estatística  $F_{IT}$  (Quadro 6), neste trabalho, mostra que se, as três espécies se fundissem numa única população, haveria um excesso de homozigotos (52,5%) e  $F_{ST}$  mostra que as três não diferem muito entre si na média dos 19 *loci* detectados.

Quadro 6 - Estatística F de Sewall Wright para cada *locus* de amostras de três espécies de *Rhamdia*, *R. quelen*, *R. branneri* e *R. voulezi* de tanques de piscicultura. N = número de indivíduos analisados;  $F_{IS}$  = Índice de Fixação Media;  $F_{IT}$  = Índice de Fixação caso a população se funda;  $F_{ST}$  = índice de identidade genética < 0,85

Locus	N	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
<i>AAT-1</i>	95	0,1315***	0,1785***	0,0541**
<i>ADH-1</i>	45	1,0000***	1,0000***	0,0648 ns
<i>EST-1</i>	72	0,3535***	0,3625***	0,0140***
<i>GDH</i>	71	1,0000***	1,0000***	0,0067 ns
<i>G3P-2</i>	65	0,4512***	0,4577***	0,0119 ns
<i>IDH-1</i>	86	0,0987***	0,1136***	0,0165 ns
<i>IDH-2</i>	84	-0,0333 ns	-0,0109 ns	0,0217 ns
<i>LDH-A</i>	102	0,7888***	0,7910***	0,0104 ns
<i>MDH-A</i>	89	0,9679***	0,9692***	0,0405*
<i>ME-1</i>	88	1,0000***	1,0000***	0,0865**
<i>ME-2</i>	79	0,6667***	0,6734***	0,0201 ns
<i>PER-2</i>	95	1,0000***	1,0000***	0,0198 ns
<i>PGM-1</i>	96	-0,0145 ns	-0,0048 ns	0,0096 ns
Média	90,5	0,5604***	0,5728***	0,0283 ns

Teste qui-quadrado ns = não significante; \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$  \*\*\* =  $P < 0,001$ .

Frankham (2008) discute os problemas referentes ao uso de espécies criadas em cativeiro para serem devolvidas ao seu habitat natural, a fim de evitar sua extinção. O autor revê evidências empíricas sobre a base genética das mudanças que possibilitam adaptação em cativeiro e meios para minimizar efeitos deletérios dessa adaptação, sendo um deles a diminuição do número de gerações obtidas em tanques de piscicultura.

O Quadro 7 demonstra os valores de identidade e distância genética entre as três espécies de *Rhamdia*.

Quadro 7 - Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1978) entre amostras de três espécies de *Rhamdia* de tanques de piscicultura

Espécie	<i>R. quelen</i>	<i>R. branneri</i>	<i>R. voulezi</i>
<i>R. quelen</i>	****	0,9940	0,9875
<i>R. branneri</i>	0,0060	****	0,9918
<i>R. voulezi</i>	0,0126	0,0083	****

O dendrograma (Figura 4), construído pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean), mostra que *R. quelen* e *R. branneri* são geneticamente mais parecidas entre si do que com *R. voulezi* ).

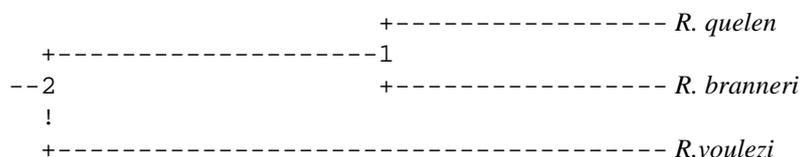


Figura 4 - Dendrograma baseado nos valores de distância genética de Nei (1972) Método UPGMA

Embora a amostragem dos indivíduos analisados não seja suficiente para conclusões inequívocas, os dados sugerem que, mesmo havendo uma alta variabilidade genética nas três espécies analisadas, o excesso de homozigotos seja fruto do sistema de manejo das matrizes mantidas nos tanques de pisciculturas, que incluem a escolha dos machos e fêmeas para fecundação, tempo que essas matrizes são mantidas nos tanques e se há reposição de matrizes utilizando seus descendentes.

Kawaguici e Kageyama (2001), estudando a diversidade genética de três grupos de indivíduos de *Callophyllum brasilienses*, por meio de marcadores isoenzimáticos, encontraram excesso de indivíduos homozigotos, embora com variabilidade genética alta. Os autores sugerem que a seleção de homozigotos se dê pela adaptação ao meio em que estas plantas estão inseridas, ou seja, saturado de água.

Pode-se sugerir uma hipótese de seleção contra heterozigotos, embora o contrário seja mais vantajoso (seleção a favor do heterozigoto), uma vez que este possui dois alelos diferentes, aumentando a plasticidade genética da espécie. Neste estudo parece que indivíduos homozigotos são os selecionados. Os peixes de incubadoras e tanques estão restritos a ambientes que não o natural e a seleção pode estar favorecendo alelos e combinações mais favoráveis a esse ambiente. Entretanto, em habitat natural, essas combinações podem não ser tão desejáveis para a espécie.

Outra variável a ser considerada é a taxa de mortalidade após fecundação e permanência na incubadora. Em um estudo de indução artificial da ovulação feita com *Rhamdia quelen* no leito do Rio Uberabinha, os autores relatam que não houve como observar a ocorrência de mortalidade durante o processo só considerando o total de alevinos obtidos (Guilherme et al, 2007). Neste trabalho, podemos sugerir que a taxa de mortalidade poderia estar influenciando na seleção de homozigotos, explicando os valores obtidos. Sabe-se que os zigotos, após fecundação, são transferidos para a incubadora em ambiente controlado e não há como estimar com precisão quantos indivíduos foram fecundados e quantos desses sobreviveram.

Podemos considerar que, se esses indivíduos homozigotos estão se reproduzindo no habitat natural, eles podem estar mantendo uma maior variabilidade genética nos rios e reservatórios. Porém não dispomos de técnicas para averiguar a taxa de sobrevivência destes indivíduos após a soltura sendo, portanto, impossível avaliar as conseqüências de indivíduos homozigotos no habitat natural.

Os dados obtidos neste trabalho revelam que é importante que estes programas de repovoamento tenham métodos genéticos para avaliar as progênies que estão sendo devolvidas nos reservatórios, a fim de maximizar a variabilidade genética destas por longos períodos e ainda fornecer subsídios para corrigir possíveis falhas nos programas.

## 5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos por meio de marcadores isoenzimáticos revelam que as três espécies de *Rhamdia*, do rio Paraná e rio Iguazu, que são mantidas em cativeiro para programa de repovoamento, apresentam alta variabilidade genética, com valores de heterozigosidade esperada acima do esperado para peixes de água doce.

Porém, os valores de  $F_{IS}$  obtidos mostram um excesso de homozigotos nas três populações analisadas.

Conclui-se que, no momento, o programa de repovoamento usando essas espécies ainda mantém uma boa variabilidade genética.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUCARMA, M.; MARTINS-SANTOS, I.C. Karyotype and B chromosome of *Rhamdia* species (Pisces, Pimelodidae) endemic in the river Iguazu basin. **Cytologia**, 66:299-306, 2001.
- AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M.; GOMES, L.C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, 1:70-78, 2005.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 2006. 627p.
- ALLCOCK, A.L.; CHAUVET, M.; CRANDALL, K.A.; GIVEN, D.R.; HALL, S.J.G.; IRIONDO, J.M.; LEWINSOHN, T.M.; LYNCH, S.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; STACKEBRANDT, E.; TEMPLETON, A.R.; WATTS, P.C. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: HEYWOOD, V.H.; WATSON, R.T. **Global Biodiversity Assessment**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 57-88.
- ALLENDORF, W.F.; PHELLPS, S.R. Loss of Genetic Variation in a Hatchery Stock of Cutthroat Trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, 109:537-543, 1980.
- ANTI, A.B. Caracterização de germoplasma de soja e de feijão através de eletroforese de isoenzimas da semente. **Bragantia**, 59:139-142, 2000.
- ANZA, J.A. **Revisão das espécies do gênero *Rhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae) de drenagens costeiras do sul e sudeste do Brasil - um exemplo de diversidade subestimada do gênero**. Porto Alegre: Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. 148p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal).
- ASTORGA, M.; GALLEGUILLOS, R. Divergência genética de jureles del género *Trachurus* desde el Pacífico noroeste y sureste. **Revista de Biología Marina y Oceanográfica**, 33:155-161, 1998.

- AVISE, J.C. Systematic value of electrophoretic data. **Systematic Zoology**, 23:465-481, 1975.
- AVISE, J.C. **Molecular markes, natural history and evolution**. London: Chapman & Hall, 1994. 536p.
- AYALA, F.J. Enzymes as taxonomic characters. In: OXFORD, G.S.; ROLLINSON, D. **Protein polymorphism: adaptive and taxonomic significance**. London: Academic Press, 1983, p. 3-26.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E.; MORAN, P. Maintenance of a small anadromous subpopulation of brown trout (*Salmo trutta* L.) by straying. **Freshwater Biology**, 51:351-358, 2006.
- BARRERO, N.M.L.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; GOMES, P.C.; VARGAS, L.; OLIVEIRA, S.N. Caracterización genética de lotes de peces usados en programas de repoblamiento y su importancia en la conservación genética en la piscicultura. **Zootecnia Tropical**, 26:515-522, 2008a.
- BARRERO, N.M.L.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A.; MANGOLIN, C.A.; BOSO, K.M.O.; GAUDA, T. Caracterização Genética de Estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema. **Bioscience Journal**, 24:86-93, 2008b.
- BARROSO, R.M.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H.L.M.; CABELLO, P.H.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconiane) using microsatellites. **Aquaculture**, 247:51-65, 2005.
- BERT, T.M.; MCMICHAEL, R.H.; CODY, R.P.; FORSTCHEN, A.B.; HALSTEAD, W.G.; LEBER, K.M.; O'HOP, J.; NEIDIG, C.L.; RANSIER, J.; TRINGALI, M.D.; WINDER, B.L.; KENNEDY, F.S. Evaluating red drum (*Sciaenops ocellatus*) stock enhancement strategies in a Florida estuarine system: a multidisciplinary approach. Bull. **The Natural Resources Institute for Aquaculture (Japan)**, 25:333-336, 2004.

- BOCKMANN, F.A.; GUAZELLI, G.M. Family Heptapteridae (Heptapterids). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, J.C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 406-431.
- CARAMASCHI, E.P. **Levantamento da ictiofauna do rio Paraíba do sul e ciclo reprodutivo das principais espécies, no trecho compreendido entre três rios e Campos. Aspectos reprodutivos da Ictiofauna..** Rio de Janeiro: UFRJ, 1991. 190p. (Relatório Final do Convênio ENGEVIX/FUJB/ UFRJ).
- CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, 35:187-191, 2005.
- CARVALHO, C.S.; ROSA, R.; SASSAKI K.T.; BACILA, M. Purificação e isoenzimas da lactato desidrogenase do músculo epaxial de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*. **Archives of Veterinary Science**. 3:65-72, 1998.
- CASATTI, L.; CASTRO, R.M.C. A fish community of the São Francisco river headwaters riffles, southeastern Brazil. **Ichthyology Exploration of Freshwaters**, 9:229-242, 1998.
- CAVALLI-MOLINA, S. **Variabilidade genética em populações naturais de *Relbunium hypocarpium* (Rubiaceae)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984. 231p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular).
- CLEGG, M.T.; ALLARD, R.W.; KAHLER, A.L. Is the gene unit of selection? Evidence from two experimental plant population. **Proceedings of the National Academy Sciences**, 69:2474-2478, 1990.
- COLDEBELLA, I.J.; NETO, J.R. Farelo de soja na alimentação de alevinos de Jundiá **Ciência Rural**, 32:499-503, 2002.
- CORRÊA, F.; PIEDRAS, S.R.N.; ROCHA, B.H.G. Análise isoenzimática de *Cyphocharax voga* (Hensel, 1869) coletados no Arroio Corrientes. [www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/1913](http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/1913). Acesso em: 23, setembro, 2009.

- COSTA, W.J.E.M. Feeding habits of a fish community in a tropical coastal stream, Rio Mato Grosso, Brazil. **Studies Neotropical Fauna and Environment**, 22:145-153, 1987.
- CROSS, T.F. Genetic implications of translocation and stocking of she species, with particular reference to. **Aquaculture Research**, 31:83-94, 2000.
- CROZIER, W.W. Genetic implications of hatchery rearing in Atlantic salmon: effects of rearing environment on genetic composition. **Journal of Fish Biology**, 52:1014-1025, 1998.
- DIAS, M.T.; MELO, J.F.B.; MORAES, J.; MORAIS, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (pimelodidae). **Ciência Rural**, 32: 693-698, 2002.
- EVANS, B.; BARLETT, N.; SWEIJ, P.; COOK, P.; ELLIOTT, N.G. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). **Aquaculture**, 26:109-127, 2004.
- FALCÃO, T.M.M.A.; CONTEL, E.P.B. Genetic variability in populations of Brazilian social bees: III. Electrophoretic data for ME, GPD, SOD, and IDH. **Revista Brasileira de Genética**, 14:61-72, 1991.
- FARRINGTON, L.W.; AUGUSTIN, C.M. Allozyme variation and stock structure in the black bream, *Acanthopagrus butcheri* (Munro) (Sparidae) in southern Australia: implications for fisheries management, aquaculture and taxonomic relationship with *Acanthopagrus australis* (Guenther). **Fisheries Management and Ecology**, 7:265-279, 2000.
- FERGUSON, M.M. The role of molecular genetic markers in the management of culture fishes. **Reviews in fish Biology and Fisheries**, 4:351-373, 1994.
- FERGUSON, M.M.; IHSSSEN, P.E.; HYNES; J.D. Are culture stocks of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) genetically similar to their soucer populations? **Canadian Journal of Fisheries and Aquactic Science**, 48:118-123, 1998.

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 53p.
- FERREIRA, A.A.; NUÑER, A.P.O.; ESQUIVEL, J.R. Influência do pH sobre ovos e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Osteichthyes, Siluriformes). **Acta Scientiarum**, 23:477-481, 2001.
- FINNEGAN, J.R.; SALAZAR, S.; STEVENS, A.K. Assessing the long-term genetic impact of historical stocking events on contemporary populations of Atlantic salmon. **Fisheries Management and Ecology**, 15:315-326, 2008.
- FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M.; WEINGARTNER M.; FILHO, E.Z. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, 26:345-352, 2004.
- FRANKHAM, R. Genetic adaptation to captivity in species conservation Programs. **Molecular Ecology**, 17:25-333, 2008.
- FREITAS, J.E.P.; ARAÚJO, M.E.; SOLÉ-CAVA, A.M. Estruturação genética das populações de duas espécies de peixes recifais do atol das rocas e da costa do ceará. **Tropical Oceanography**, 31:193-201, 2003.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2002. 632p.
- GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPARI, R.G.; BALDISSERITTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, 30:179-185, 2000.
- GOTTLIEB, L.D. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. invertebrate systematics. **Zoologica Scripta**, 23:3-18, 1971.
- GRAEFF, A.; PRUNER, E.N.; TOMAZELLI, A. Desenvolvimento corporal de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas completas contendo diferentes níveis de energia na fase de pós-larvas. **REDVET. Revista Eletrônica de Veterinária**, 10:1-11, 2009.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia* sp) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae).** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1980. 100p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

GUILHERME, L.C.; MORELLI, S.; MOURA, M.R.; SILVA N.R. Indução artificial da ovulação do *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) em reprodutores capturados no leito do Rio Uberabinha – Relato de caso. **Veterinária Notícias**, 13:55-61, 2007.

GURGEL, J.J.S. **Manual sobre manejo de reservatórios para a produção de peixes.** 1988. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab486p/ab486p04.htm>. Acesso em: 29/6/2009.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. **Handbook of enzyme electrophoresis in Human Genetics.** Amsterdam: North-Holland Co, 1978.

HASEMAN, J.D.; EIGENMANN, C.H. A brief report upon the expedition of the Carnegie Museum to Central South America. **Annals of the Carnegie Museum**, 7:287-314, 1911.

HUNTER, R.L.; MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, 125:1294-1295, 1957.

IBAMA. **Estatísticas da pesca 2005.** Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, 2007. 147p.

INGENITO, L.F.S.; DUBOC, L.F.; ABILHOA, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto Rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arquivo de Ciências Veterinária**, 7:23-36, 2004.

JUNIOR, H.A.; ALMEIDA, D.R.; SILVA, F.Q.; GARCIA, S. Avaliação do jundiá (*Rhamdia quelen*) em diferentes sistemas de cultivo para a região do litoral centro norte de Santa Catarina, Brazil. **REDVET. Revista Eletrônica de Veterinária**, 9:1-7, 2008.

KANTEK, D.L.Z.; CIPRIANO, R.R.; ABILHOA, V.; ARTONI, R.F.; CESTARI, M.M. Cytotaxonomic and evolutionary considerations about karyotypic data of

fishes from the Iguazu River Basin in South of Brazil. **Brazilian Archives of biology and Technology**, 50:793-802, 2007.

KAWAGUICI, C.B.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Callophyllum brasilienses* em uma população de mata de galeria. **Scientia Forestalis**, 59:131-143, 2001.

KESSELI, R.V.; MICHELMORE, R.W. Genetic variation and phylogenesis detected from isozyme markers in species of *Lactuca*. **Journal of Heredity**, 77:324-331, 1986.

LAMAS, I.R. **Análise de características reprodutivas de peixes brasileiros de água doce, com ênfase no local de desova**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1993. 72p. Tese (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre).

LASSALA, M.D.P.; RENESTO, E. Reproductive strategies and genetic variability in tropical freshwater fish. **Genetics and Molecular Biology**, 30:690-697, 2007.

LIDANI, K.C.F.; LIMA, J.R.; TORRES, R.A.; GABRIEL, J.E.; MADEIRAS, H.M.F.; CARNEIROS, P.C.F. Variabilidade genética de um estoque cativo de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Revista Acadêmica**, 4:47-53, 2006.

LIMEIRA, D.M.; RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H. Isozyme comparison of two populations of *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) from the Ivaí River, upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 32:431-435, 2009.

LIU, Y.; CHEN, S.; LI, J.; LI, B. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers. **Aquaculture**, 255:565-572, 2006.

LOPERA-BARRERO, N.M. **Diversidade genética de populações de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com a técnica de RAPD**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005. 45p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

LOPES, T.S.; RIBEIRO, R.P.; BARRERO, N.M.L.; SIROL, R.N.; POVH, J.A.; GOMES, P.C.; VARGAS, L. Caracterização genética de estoques de curimba

(*Prochilodus lineatus*) utilizados em programas de repovoamento. **Revista Brasileira de Saúde**, 9:652-661, 2008.

MAESTRE-SERRANO, R.; GUEVARA-ROZO, E.; ESCAMILLA, I.C.; MUÑOZ, E.P. Expresión de isoenzimas de l-lactato: nad<sup>+</sup> óxido-reductasa (ldh; ec. 1.1.1.27) durante el desarrollo embrionario del pez combatiente siames betta splendens (regan, 1909). **Revista de la Facultad de Ciências, Universitas Scientiarum**, 13:11-20, 2008.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 45:753-763, 1959.

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P.; TEIXEIRA, C.S.; SOUSA, A.B.; COELHO, E.G.A.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A. Genetic characterization of six commercial stocks of tilapia (*Oreochromis* spp) using microsatellite markers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58:87-93, 2006.

METTLER, L.E.; GREGG, T.G. **Genética de populações e evolução**. São Paulo: EDUSP, 1973. 262p.

MORI, E.S. **Variabilidade genética isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maden submetida a diferentes intensidades de seleção**. Piracicaba: ESALQ, 1993. 119p. Tese (Doutorado em Agronomia).

MURPHY, R.W.; SITES, J.W.; BUTH, D.G.; HAUFLE, C.H. Proteins: Isozyme. Electrophoresis. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.M. **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 51-120.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, 106:283-291, 1972.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

- NEVO, E. Genetic variation in natural populations patterns and theory. **Theor. Pop. Biol.**, 13:121-177, 1978.
- ORTEGA-VILLAIZÁN ROMO, M.M.; ARITAKI, M.; TANIGUCHI, N. Pedigree analysis of recaptured fish in the stock enhancement program of spotted halibut *Verasper variegates*. **Fisheries Science**, 72:48-52, 2000.
- PARRA, J.E.G.; NETO, J.R.; VEIVERBERG, C.A.; LAZZARI, R.; BERGAMIN, G.T.; PEDRON, F.A.; ROSSATO, S.; SUTILI, F.J. Alimentação de fêmeas de jundiá com fontes lipídicas e sua relação com o desenvolvimento embrionário e larval. **Ciência Rural**, 38:2011-20017, 2008.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTONDAVIDIAN, J. **Practical isozyme genetics**. Chichester: Ellis Horwood, 1988. 215p.
- PELECICE, F.M.; AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. Biodiversidade e conservação de peixes na planície de inundação do alto rio Paraná. **Caderno de Biodiversidade**, 5:34-44, 2005.
- PERES, M.D.; RENESTO, E.; LAPENTA, A.S.; ZAWADZKI, C.H. Genetic variability in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes: Erythrinidae) in fluvial and lacustrine environments in the upper Paraná River floodplain (Paraná state, Brazil). **Biochemical Genetics**, 40:209-223, 2002.
- PERES, M.D.; RENESTO, E. Genetic variability in a *Leporinus lacustris* Campos, 1945. (Osteichthyes: Anostomidae) population from Lagoa do Carão (Upper Paraná River floodplain), Brazil. **Acta Scientiarum**, 27:79-84, 2005.
- PHILIPPART, J.C. Captive breeding an effective solution for the preservation of endemic species? **Biological Conservation**, 72:281-295, 1995.
- PHILIPPSSEN, J.S.; RENESTO, E.; GEHL, A.M.; ARTONI, R.F.; SHIBATTA, O.A.; ZAWADZKI, C.H. Genetic variability in four samples of *Neoplecostomus yapo* (Teleostei: Loricariidae) from the rio Paranapanema basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 7:25-30, 2009.

PIAIA, R.; TOWNSEND, C.R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. **Aquaculture Internacional**, 7:201-205, 1999.

PIAIA, R.; BALDISSEROTTO, B. Densidade de estocagem e crescimento de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, 30:509-513, 2000.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; STREIT, D.P.J.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; GOMES, P.C.; LOPES, T.S. Diversidade genética do pacu do rio Paranapanema. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:201-206, 2008.

RANDÜNZ NETO, J. **Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas de jundiá *Rhamdia quelen***. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1981. 77 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

REIDEL, A. **Níveis de energia e proteína na alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*) criados em tanquesrede**. Jaboticabal: UNESP, 2007. 85p. Tese (Doutorado em Aqüicultura).

REIS, C.A.F. **Diversidade genética de plântulas, árvores jovens e adultas de *Calophyllum brasiliense* Camb. em uma floresta paludosa**. Lavras: UFLA, 2006. 40p. Monografia (Bacharel em Ciências Florestais).

RENESTO, E.; PERES, M.D. Estimativa da variabilidade genética de peixes da planície de inundação do alto Rio Paraná evidenciada por marcadores moleculares. *Genética de Peixes*. In: AGOSTINHO, A.A.; TOMAZ, M.S.; RODRIGUES, L.; GOMES, C.L. **Relatório Anual (PELD – Sítio 6)**. Maringá: EDUEM, 2003. p. 61-62.

RESENDE, E.K.; RIBEIRO, R.P.; LEGA, A.P. **Melhoramento genético em peixes – Uma revolução na aquicultura do Brasil**. Disponível em: <<http://www.biotechbrasil.bio.br/2008/09/27/melhoramento-genetico-em-peixes---uma-revolucao-na-aquicultura-do-brasil/>> Acesso em: 08/11/2009.

- REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná River. **Brazilian Journal of Genetics**, 20:381-388, 1997.
- RICHARDSON, B.J.; BAVERSTOCK, P.R.; ADAMS, M. **Allozyme electrophoresis**. Sydney: Academic Press, 1986. 410p.
- ROSSITER, J.G.A.; MUSSER, R.S.; MARTINS, L.S.S.; PEDROSA, E.M.; MEDEIROS, J.E. Seleção de genótipos de aceroleira assistida por marcadores isoenzimáticos visando à resistência a *meloidogyne incognita* raça 21. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30:1057-1064, 2008.
- RUIZ-CARUS, R.; ALCOCER, M.U. Phylogenetic assessment of *Eucinostomus gula*, *Eugerres plumieri*, and *Diapterus auratus* (Pisces: Gerreidae) based on allozyme and mtDNA analyses. **Caribbean Journal of Science**, 39:109-115, 2003.
- RYMAN, N.; UTTER, F. **Population genetics & fisher management**. Seattle: University of Washington Press, 1987. 144p.
- RYMAN, N.; LAIKRE, L. Effects of supportive breeding on the genetically effective population size. **Biological Conservation**, 5:325-329, 1991.
- SANDOVAL-CASTELLANOS, E.; DÍAZ-JAIMES, P.; URIBE-ALCOCER, M. Diferenciación genética poblacional en robalos (pisces: centropomidae) del pacífico mexicano. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, 21:35-41, 2005.
- SARGENT, J.R.; GEORGE, S.F. **Methods in zone electrophoresis**. Poole: BDH Chemicals, 1975. 219p.
- SEKINO, M.; HARA, M.; TANIGUCHI, N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, 213:101-122, 2002.
- SHAW, C.R.; PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, 4:297-320, 1970.
- SHIELDS, C.R.; ORTON, T.J.; STUBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from

plant tissue. In: TANSKLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in Plant genetics and Breeding**. New York: Elsevier, 1983. p. 443-468.

SILFVERGRIP, A.M.C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm: University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996. 156p. (Department of Zoology).

SILVA, J.C.; VAZ, B.S.; CERQUEIRA, G.M.; ALMEIDA, D.B.; COSTA, M.A.P.; MOREIRA, C.G.A.; AMARAL, C.O.; MANZKE, V.H.B.; MOREIRA, H.L.M. Seqüenciamento da região codificadora do gene do hormônio de crescimento de jundiá (*Rhamdia quelen*). Disponível em [www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CB/CB\\_01121.pdf](http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CB/CB_01121.pdf). Acesso em: 15, agosto, 2009.

SILVA, J.C.; VAZ, B.S.; CERQUEIRA, G.M.; ALMEIDA, D.B.; COSTA, M.A.P.; MOREIRA, C.G.A.; TAVARES, R.A.; BASSINI, L.N.; OLIVEIRA, P.A.; MOREI, A.H.L.M. Estimativa do polimorfismo genético no *locus* do hormônio do crescimento de jundiá (*Rhamdia quelen*). Disponível em [www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CB/CB\\_01121.pdf](http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CB/CB_01121.pdf). Acesso em: 15, agosto, 2009.

SIROL, N.R; BRITO, G.S. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. **Ecologia de reservatórios. impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em casacata**. São Carlos: RiMa, 2006. p. 273-284.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, 61:629-641, 1955.

SODRÉ, L.M.K.; ALMEIDA, F.S. Analysis of genetic variability in three species of Pimelodidae (Ostariophysi – Siluriformes). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, 21:487-492, 1998.

- SOLÉ-CAVA, A.M.; VORREN, C.M.; LEVY, J.A. Isozymic differentiation of two sibling species of squatina (chondrichthyes) in south Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75b:355-358, 1983.
- SOLÉ-CAVA, A.M.; THORPE, J.P. High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. *Biological Journal Linnean Society*, 44:65-80, 1991.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2001. p. 172-192.
- SOSTENBO, J.H.; BORGSTROM, R.; HEUN, M. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. **Conservation Genetics**, Dordrecht, 8:33-44, 2007.
- SOUZA, L.S.; POUHEY, J.L.O.F.; CAMARGO, S.O.; VAZ, B.S. Crescimento e sobrevivência do catfish de canal (*Ictalurus punctatus*) e jundiá (*Rhamdia* sp) no outono–inverno do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, 35:891-896, 2005.
- TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**. New York: Elsevier, 1983. 516p.
- THORPE, J.P.; SOLÉ-CAVA, A.M. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. **Zoológica Scripta**, 23:3-18, 1994.
- TOLEDO-FILHO, S.A; ALMEIDA-TOLEDO, L.F; FORESTI, F; GALHARDO, E; DONOLA, E. **Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios**. São Paulo: USP, 1992. 39p. (Cadernos de Ictiogenética 1)
- TORRES, R.A.; MATOSO, D.A.; ARTONI, R.F. Genética de peixes neotropicais. *biologia molecular de peixes neotropicais*. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, 10:27-37, 2004.
- VAL, A.L.; SCHWANTES, A.R.; SCHWANTES, M.L.B.; LUCA, P.H. Amido hidrolisado em milho como suporte eletroforético. **Ciência e Cultura**, 33:992-996, 1981.

VENDEL, A.L.; ROSA, I.L.; FARIAS, R.C.A.P.; CASTRO, A.L.C. **Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia**, n° 79, 2005. Disponível em: <<http://www.sbi.bio.br/boletins/BOLETIM79.pdf> > Acesso em: 08, junho, 2009.

WARD, R.D.; SKIBINSKI, D.O.F.; WOODWARD, M. Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. **Evolutionary Biology**, 26:73-159, 1992.

WAS, A.; WENNE, R. Genetic differentiation in hatchery and wild sea Trout *Salmo trutta* in the Southern Baltic at microsatellite loci. **Aquaculture**, 204:493-506, 2002.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE version 131**: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta, 1999.

ZAWADZKI, C.H.; RENESTO, E.; PAIVA, S.; LARA-KAMEI, M.C.S. Allozyme differentiation of four populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genética**, 121:251-257, 2004.

ZAWADZKI, C.H.; RENESTO, E.; REIS, R.E.; MOURA, M.O.; MATEUS, R.P. Allozyme relationships in *hipostomines* (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genética**, 123:271-283, 2005.

## **APÊNDICE**

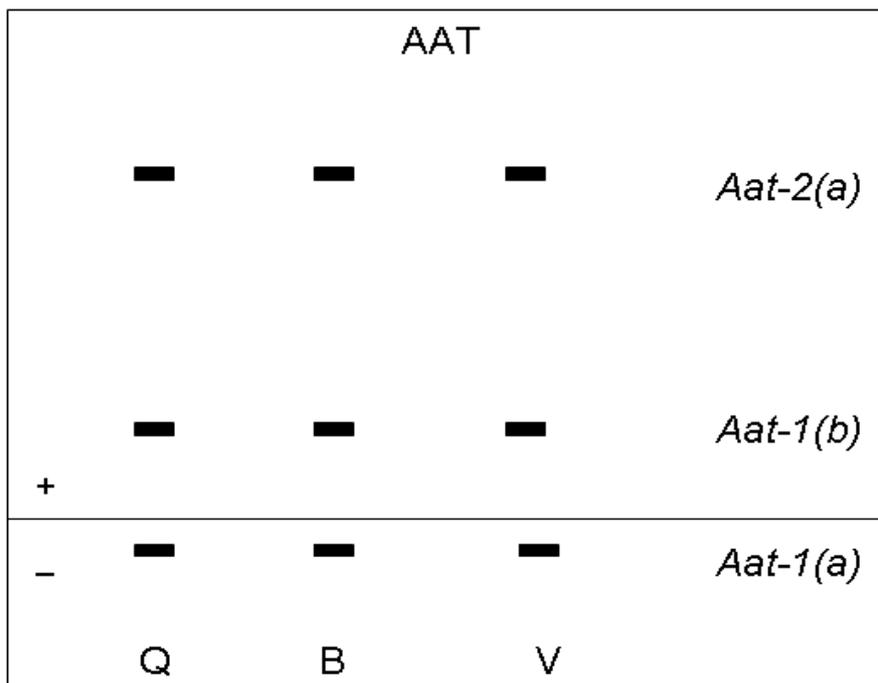


Figura 1A - Zimograma da enzima AAT em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.

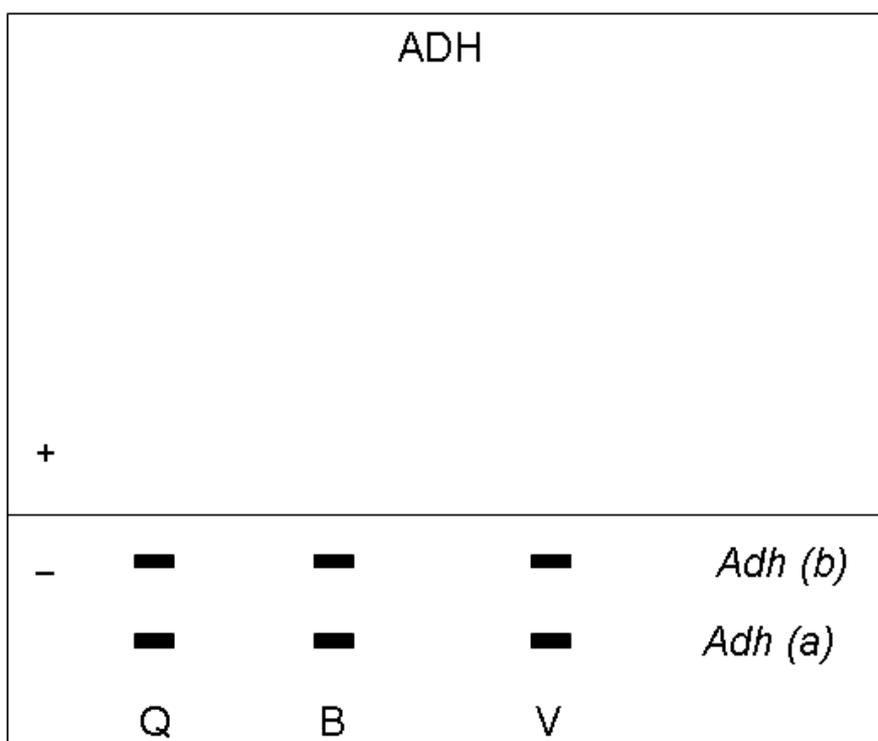


Figura 2A - Zimograma da enzima ADH em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.

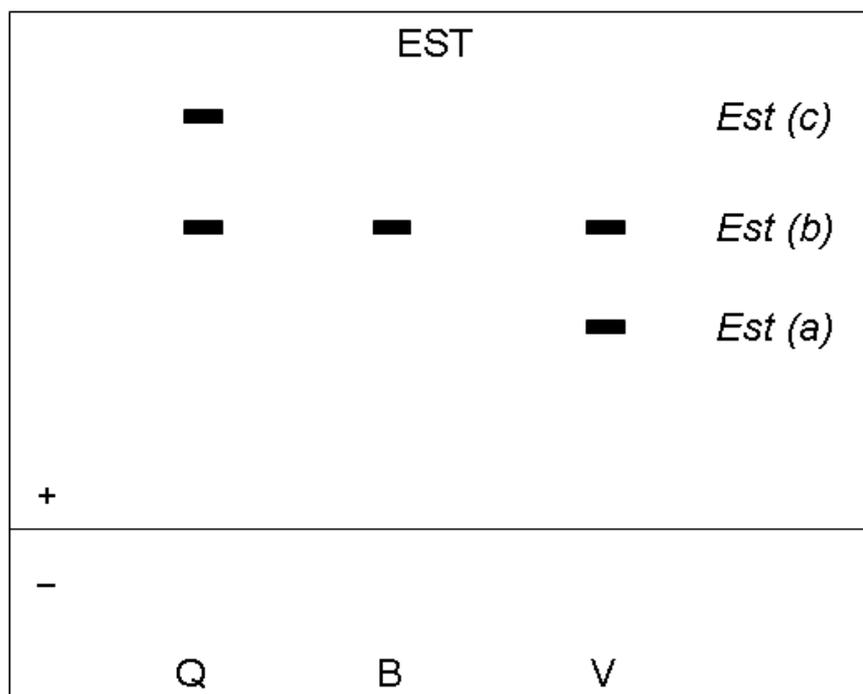


Figura 3A - Zimograma da enzima EST em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.

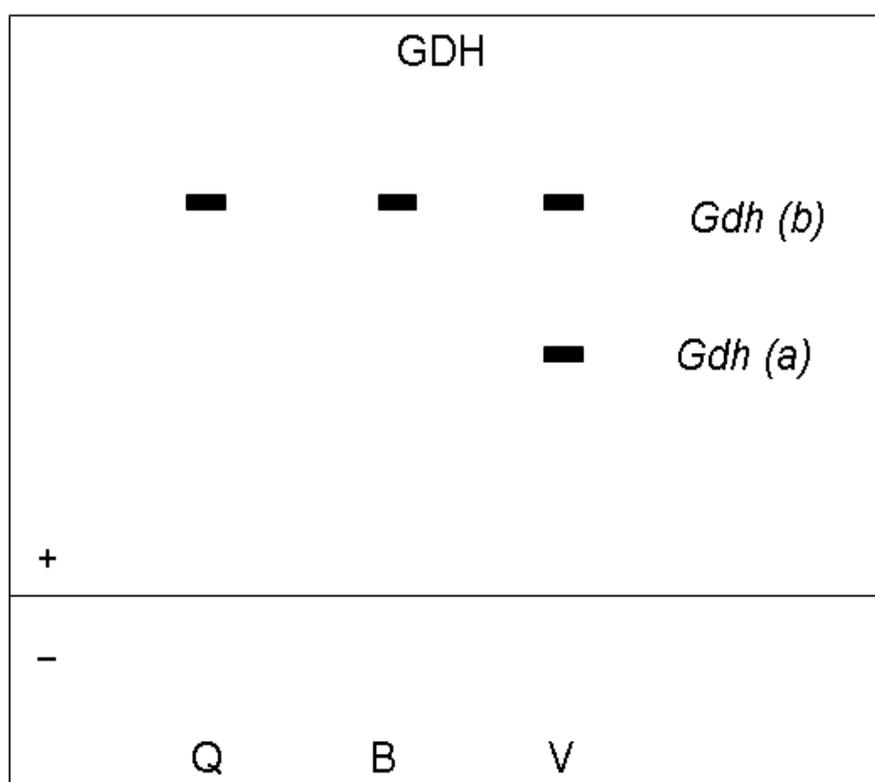


Figura 4A - Zimograma da enzima GDH em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.

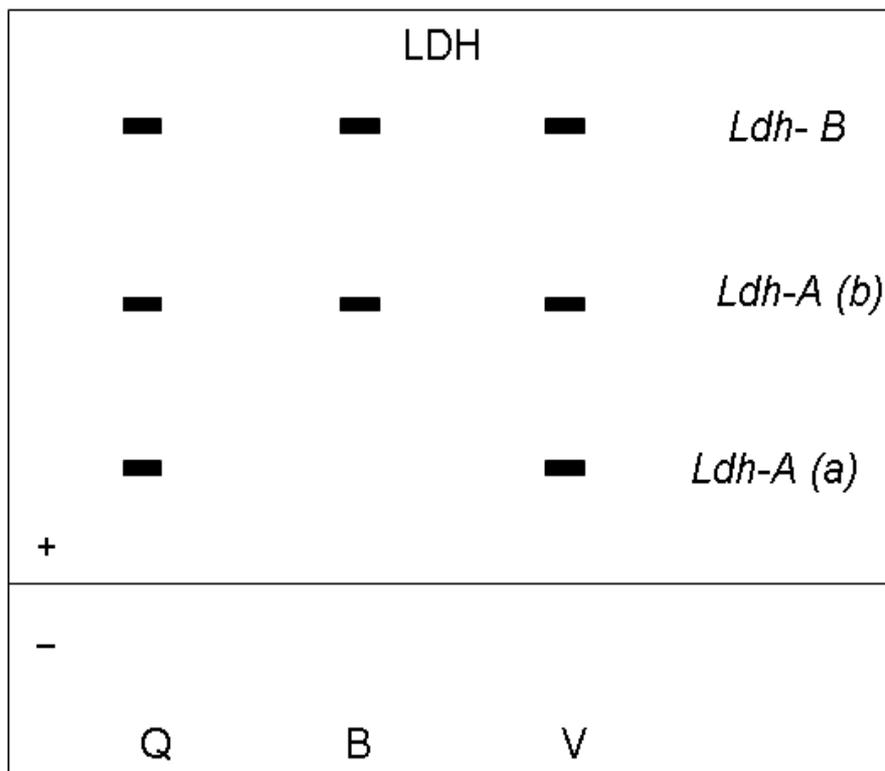


Figura 5A - Zimograma da enzima LDH em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.

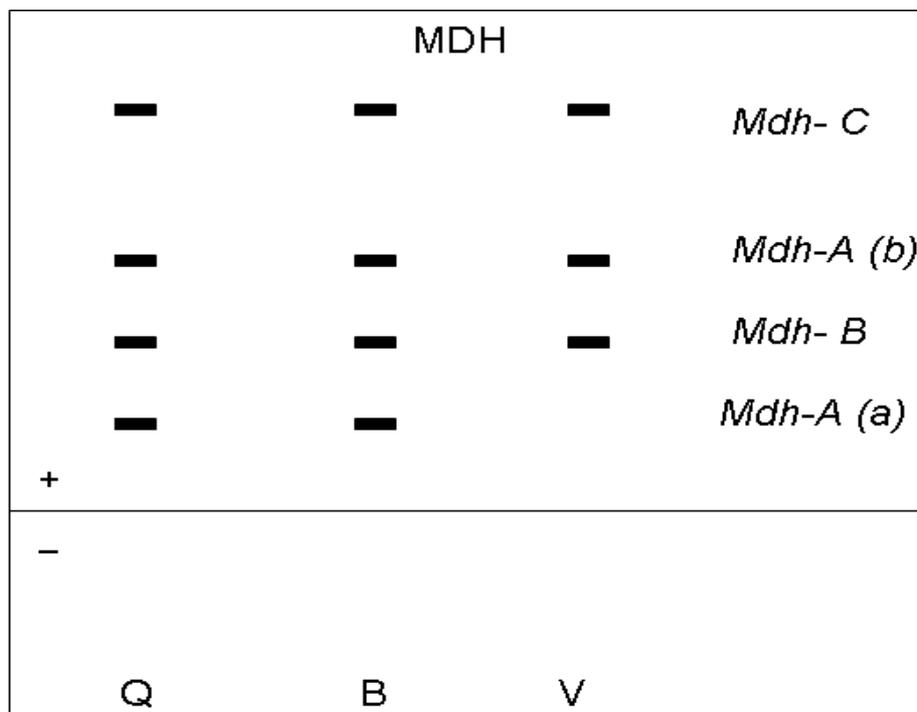


Figura 6A - Zimograma da enzima MDH em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.

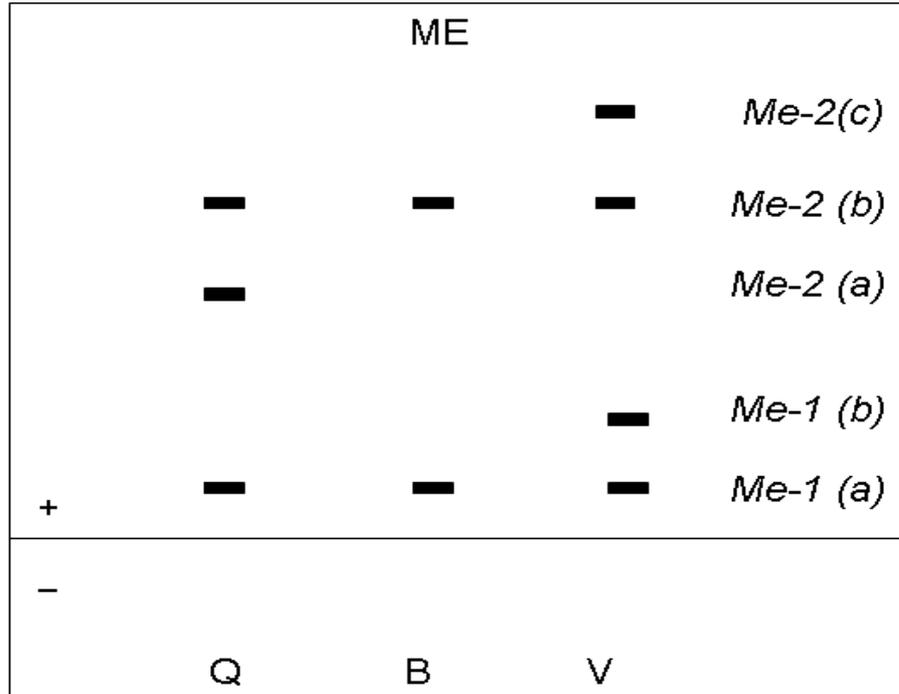


Figura 7A - Zimograma da enzima LDH em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.

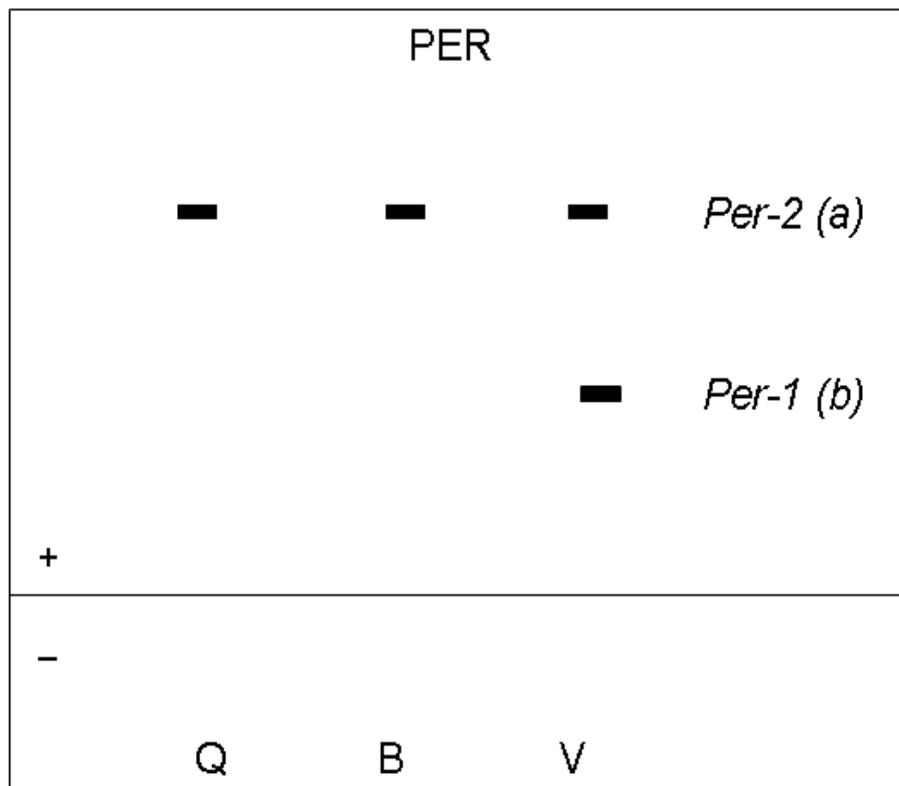


Figura 8A - Zimograma da enzima PER em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.

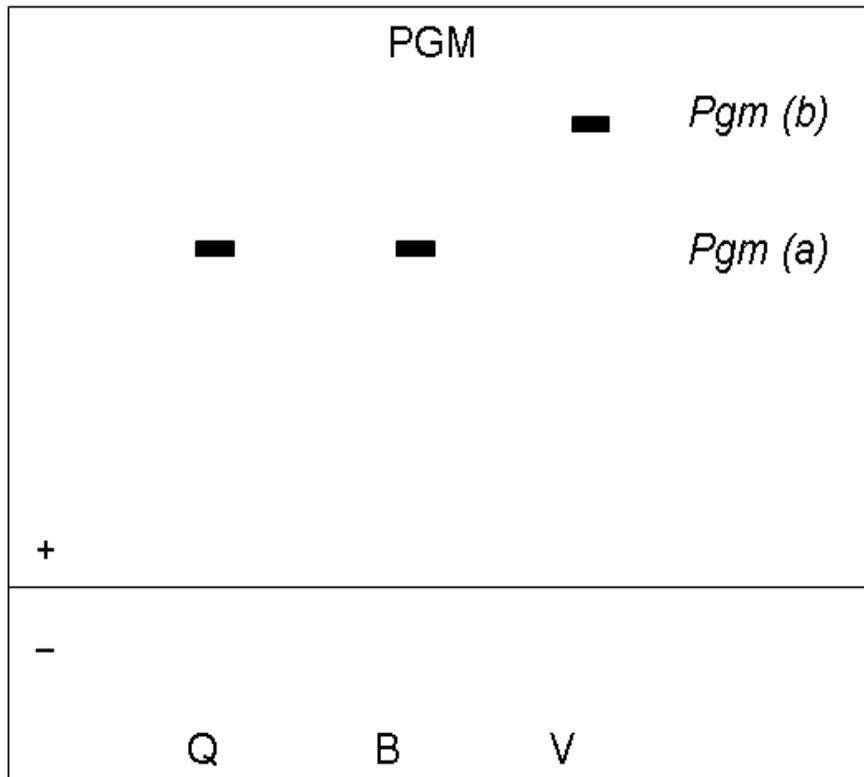


Figura 9A - Zimograma da enzima PGM em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.

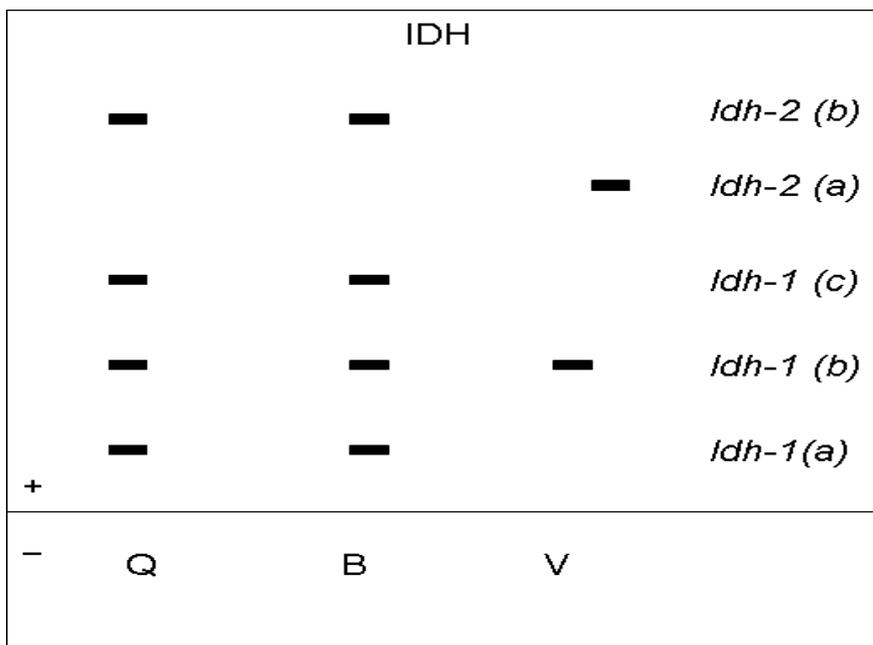


Figura 10A - Zimograma da enzima IDH em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.

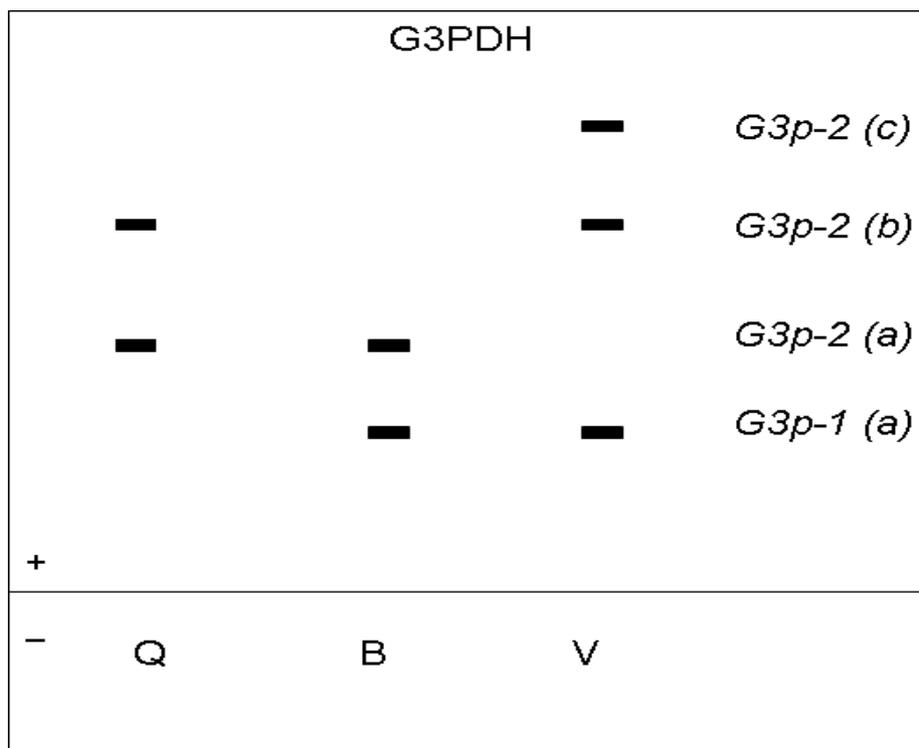


Figura 11A - Zimograma da enzima G3PDH em gel de amido das três espécies de *Rhamdia*. **Q**= *R. quelen*; **B**= *R. branneri*; **V**= *R. voulezi*.