

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

LIÉGIE ALHER MARQUES

**Variabilidade genética de *Hemiodus orthonops* Eigenmann & Kennedy,
1903 e duas espécies de *Leporinus* Agassiz, 1829 da bacia do alto rio
Paraná, Brasil**

**MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
FEVEREIRO-2014**

LIÉGIE ALHER MARQUES

Variabilidade genética de *Hemiodus orthonops* Eigenmann & Kennedy, 1903 e duas espécies de *Leporinus* Agassiz, 1829 da bacia do alto rio Paraná, Brasil

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Renesto.

MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
FEVEREIRO-2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a minha força. Ele é o autor da minha vida e a Quem pertence tudo o que sou e tenho.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade, e aos respectivos professores, pela imensurável contribuição para o meu crescimento e formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Orientador, professor doutor Erasmo Renesto, pela grande contribuição em minha formação profissional, pelo profissionalismo e nobreza no trato com as questões pessoais e didáticas.

Aos meus colegas de Laboratório, de forma especial, ao Henrique Bueno Ruiz, pela ajuda na coleta dos peixes.

Aos meus pais, Nelson Marques e Lenir Marques, e aos meus irmãos, Lucas e Maria Fernanda, por todo amor, toda dedicação e paciência, enfim, pela presença incondicional em minha vida.

Ao meu marido, Fábio Garcia, pela compreensão e pelo apoio. Você faz parte desta vitória.

Às muitas pessoas que passaram pela minha vida, deixando grandes contribuições, ensinando-me a recomeçar e a seguir em busca de meus ideais.

BIOGRAFIA

LIÉGIE ALHER MARQUES, filha de Nelson Marques e Lenir Alher Marques, nasceu em 08 de outubro de 1988, na cidade de Engenheiro Beltrão, estado do Paraná.

Concluiu o Ensino Fundamental, em 2002, no Colégio Pequeno Príncipe, na cidade de Cianorte, estado do Paraná. O Ensino Médio concluiu, em 2005, no colégio Dr. Gastão Vidigal, em Maringá, estado do Paraná.

Ingressou, em janeiro de 2007, no Curso de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná, obtendo o título de Zootecnista em janeiro de 2012.

Em março de 2012, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brasil.

SUMARIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Ordem Characiformes.....	4
2.2. Família Hemiodontidae	4
2.3. <i>Hemiodus orthonops</i> (Eigenmanne Kennedy, 1903)	5
2.4. Família Anostomidae	5
2.5. <i>Leporinus elongatus</i> (Valenciennes, 1850) e <i>Leporinus friderici</i> (Bloch, 1794).....	6
2.6. Eletroforese de isoenzimas.....	8
2.7. Variabilidade genética em populações naturais e a importância de sua conservação	9
2.8. Estudos de variabilidade genética de populações naturais de peixes brasileiros com isoenzimas.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Locais de coleta.....	14
3.2. Coleta e armazenagem.....	14
3.3. Eletroforese em gel de amido	15
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida	15
3.5. Análise das isoenzimas	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÕES.....	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMO

MARQUES, Liégie Alher. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro, 2014. **Variabilidade genética de *Hemiodus orthonops* Eigenmann & Kennedy, 1903 e duas espécies de *Leporinus* Agassiz, 1829 da bacia do alto rio Paraná, Brasil.** Orientador: Erasmo Renesto. Coorientadores: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki e Claudete Aparecida Mangolin.

A planície do rio Paraná, pertencente à região neotropical, apresenta cerca de 170 espécies de peixes identificadas e entre elas estão as espécies *Hemiodus orthonops*, *Leporinus elongatus*, *Leporinus friderici*, as quais, neste estudo, tiveram a variabilidade genética estimada por meio da técnica de eletroforese de isoenzimas. Todas as espécies foram coletadas na bacia do rio Paraná. *Hemiodus orthonops* foi coletado em duas regiões: uma população na região de Marilena e a outra na região de Alto Paraíso; as demais espécies foram coletadas na região de Marilena. Foram analisados 11 sistemas enzimáticos e detectados 23 locos, totalizando 63 alelos. Em *Hemiodus orthonops*, foram detectados 27 alelos da região de Marilena, distribuídos em 21 locos, sendo 6 polimórficos (*Adh*, *G6pdh*, *Ldh-1*, *Est-2*, *Est-4*, *Est-5*); na região de Alto Paraíso, foram detectados 25 alelos, distribuídos em 21 locos, dos quais três locos foram polimórficos (*Adh*, *Est-2*, *Est-5*); a espécie *L. elongatus* apresentou 34 alelos em 22 locos, sendo sete foram polimórficos (*Gpi-1*, *Gpi-2*, *Idh-2*, *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-5*); em *L. friderici* foram detectados 34 alelos em 22 locos, com nove sendo polimórficos (*Gpi-1*, *Gpi-2*, *Idh-1*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Pgm-1*, *Est-1*, *Est-2*, *Est-5*). A população de *H. orthonops* de Alto Paraíso teve uma proporção de locos polimórficos de 13,04%, com três locos polimórficos. Para as populações de Marilena, a proporção de locos polimórficos foi de 26,09%, para *L. elongatus* foi de 34,78% e para *L. friderici* de 39,13%. As populações amostradas de *H. orthonops*, *L. elongatus* e *L. friderici* apresentaram variabilidade genética superior à média para peixes e a variabilidade genética mais baixa foi a da população de Alto Paraíso da espécie *Hemiodus orthonops*. Os valores de identidade genética de Nei mostraram que as 3 espécies são muito diferentes entre si. As populações invasoras de *Hemiodus orthonops* apresentam variabilidade genética inferior à de *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici*.

Palavras-chave: Polimorfismos genéticos, isoenzimas, *Leporinus friderici*.

ABSTRACT

MARQUES, Liégie Alher. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, February 2014. **Genetic variability *Hemiodus orthonops* Eigenmann & Kennedy, 1903 and Two species *Leporinus Agassiz 1829* in the Upper Paraná River basin, Brazil.** Adviser: Dr. Erasmo Renesto. Committee Members: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki and Claudete Aparecida Mangolin. I

The Paraná River plain belongs to the tropical region and presents about 170 species of identified fishes. Among these species, *Hemiodus orthonops*, *Leporinus elongatus*, *Leporinus friderici* were studied. Their genetic variability were estimated by isozyme electrophoresis technique. All species were collected on Paraná River basin, and *Hemiodus orthonops* were collected in two different regions: one sample in Marilena county region and another one in Alto Paraíso county region. The other species were collected in Marilena county region. There were analyzed 11 enzymatic systems and detected 23 loci in 23 alleles. In *Hemiodus orthonops* there were detected 27 alleles from Marilena county region, distributed in 21 loci, which presented 6 polymorphic loci (*Adh*, *G6pdh*, *Ldh-1*, *Est-2*, *Est-4*, *Est-5*); the *L. elongatus* specie presented 34 alleles in 22 loci, in which 7 locos were polymorphic (*Gpi-1*, *Gpi-2*, *Idh-2*, *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-5*); in *L. friderici* were detected 34 alleles in 22 locos in which 9 locos were polymorphic (*Gpi-1*, *Gpi-2*, *Idh-1*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Pgm-1*, *Est-1*, *Est-2*, *Est-5*). The *H. orthonops* population of Alto Paraíso had 13,04% of polymorphic loci . For the Marilena population, the proportion of polymorphic loci was 26,09%, for *L. elongatus* was 34,78% and for *L. friderici* was 39,13%. The samples of *H. orthonops* ., *L. elongatus* and *L. friderici* showed genetic variability above the average for fish, and the genetic variability of *Hemiodus orthonops* from Alto Paraiso was the lowest. The values of genetic identity of Nei showed that the three species are very different. The invading populations *Hemiodus orthonops*, have less genetic variability than the *Leporinus elongatus* and the *L. friderici*.

Keywords: Genetic polymorphisms, isoenzymes, *Leporinus friderici*.

1. INTRODUÇÃO

A região neotropical é representada pela América do sul, América do norte e Antilhas e se diferencia das demais regiões por possuir uma pequena parte de sua área ocupada por deserto, pela alta proporção de planícies e também por estar envolta em sua grande maioria por florestas tropicais (Wallace, 1976). Nessa região, também são encontrados o maior número de famílias de peixes de água doce (Berra, 2001). São 4.475 espécies de peixes válidas, com capacidade de atingir mais de 6.000, caso incluam-se as novas espécies reconhecidas pelos especialistas (Reis et al., 2003).

Pertencente a esta região está a planície do rio Paraná, que possui porções do Brasil meridional, Paraguai oriental, nordeste da Argentina e norte do Uruguai, com uma área de 1,5 milhões de quilômetros quadrados (Milani et al., 2007). O rio Paraná é formado pela junção dos rios Grande e Paranaíba, possui aproximadamente 4695 km de comprimento e apresenta uma bacia hidrográfica de $2,8 \times 10^6$ km², drenando a maior parte centro-sul da América do sul (Agostinho et al., 2004). Segundo Seeliger (2002), a bacia do rio Paraná apresenta cerca de 170 espécies de peixes identificadas, porém este valor pode mudar. Há fortes indícios de que haja pelo menos 250 espécies de peixes no rio Paraná e, entre estas, encontram-se as ordens de Characiformes, Siluriformes, Perciformes, Rajiformes, Cypriniformes, Pleuronectiformes, Clupeiformes, Cyprinodontiformes e Synbranchiformes. Na ordem Characiformes, encontram-se os peixes considerados com escama e a maior parte dos peixes migradores presentes no rio Paraná pertencem a esta ordem (Agostinho et al., 2003), da qual também pertencem as famílias Hemiodontidae e Anostomidae (Moreira et al., 2001).

Os peixes da família Hemiodontidae são encontrados na América do norte e sul da bacia do Paraná e Paraguai (Nelson, 2006.). Esta família apresenta 5 gêneros e 28 espécies, apresentando ainda espécies que não foram descritas (Langeani, 2003). O gênero *Hemiodus* apresenta 18 espécies. Alcança no máximo 25 cm de comprimento, sendo encontrado na América do Sul, bacia do rio Paraguai e do rio Paraná (Resende et al., 1998).

Os peixes da família Anostomidae possuem diferentes portes e são em sua maioria herbívoros, embora haja também alguns carnívoros. Possuem dentes bem desenvolvidos e o formato desta dentição influencia no hábito alimentar das

espécies encontradas nesta família. São conhecidos como “piaus” (Moreira et al., 2001; Nelson, 2006) e, segundo Garavello e Bristski (2003), existem catalogadas 132 espécies de peixes dessa família.

A diversidade genética é um fator fundamental para o equilíbrio ecológico, pois a ausência desta levaria as espécies à extinção. Os riscos ambientais hoje ocorrem devido a mudanças climáticas, como também à ação humana. Desta forma, estudar e manter a variabilidade genética são de fundamental importância para que estes riscos sejam amenizados. Como a variabilidade genética está diretamente ligada ao valor adaptativo das espécies, que por sua vez é a capacidade de manutenção e permanência da espécie no ambiente, podemos dizer que, como as mudanças climáticas são inevitáveis, a diversidade genética é necessária para que as populações possam evoluir e se adaptar a essas mudanças (Abell, 2005; Settele et al., 2005; Frankham et al., 2008).

A biodiversidade dos peixes de água doce vem sendo ameaçada por inúmeros fatores, como a exploração excessiva das espécies, a poluição da água, a modificação do fluxo, a destruição ou degradação de habitat e a invasão por espécies exóticas (Dudgeon, 2006; Agostinho, 1996; Gomiero e Braga 2006; Primack, 2002; Cucherousset e Olden, 2011; Casal, 2006; Kolar, 2001). O impacto que a invasão por espécies exóticas pode causar no ambiente pode ser devastador para as espécies nativas. Sendo assim a variabilidade genética das espécies *Hemiodus orthonops*, *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici* foram estudadas neste trabalho. Para tal, a técnica escolhida foi a de eletroforese de isoenzimas, pois o seu papel no estudo de populações de peixes e nas estratégias adaptativas é mais relevante que as técnicas para marcadores de DNA (Micales e Bonde, 1995).

A espécie *Hemiodus orthonops* possui distribuição natural na parte baixa do rio Paraná, mas tem surgido também na parte alta do rio Paraná, o que é bastante incerto para os pesquisadores (Junior, 2009). Desta forma, este estudo compara a variabilidade genética desta espécie presente na parte alta do rio Paraná com outras espécies naturalmente presentes na parte alta do rio Paraná. A diversidade genética é um fator fundamental para o equilíbrio ecológico, pois a ausência desta levaria as espécies à extinção. Como a variabilidade genética está diretamente ligada ao valor adaptativo das espécies e como as mudanças climáticas são inevitáveis, a diversidade genética é necessária para que as populações possam evoluir e se adaptar a essas mudanças (Abell, 2005; Settele et al., 2005; Frankham et al., 2008).

Espécies da família Anostomidae, como *Leporinus elongatus* e *Leporinus fiderici*, são encontradas naturalmente na parte alta do rio Paraná. (Eigenmann & Eigenmann, 1891; Vari, 1983; Vari e Williams, 1987, Garavello e Britski, 2003). A técnica de eletroforese de isoenzimas apresenta um importante papel no estudo de populações de peixes e nas estratégias adaptativas, sendo mais relevante que as técnicas para marcadores de DNA (Micales e Bonde, 1995). Essa técnica tem sido utilizada em genética de populações como uma ferramenta para estimar a variabilidade genética de populações naturais desde o trabalho pioneiro de Hubby e Lewontin (1966). Em peixes, os resultados assim obtidos têm sido aplicados a estudos evolutivos (Shaklee, 1982), taxonômicos (Renesto, et al., 2001; Chiari e Sodré, 1999) e filogenéticos (Zawadzki, 2001), bem como à delimitação de estoques de espécies exploradas comercialmente (Revaldaves et al., 1997).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ordem Characiformes

A ordem Characiformes possui 80 famílias, com 270 gêneros e 1674 espécies, todos vivendo em água doce. Pelo menos 209 espécies estão presentes na África, com o restante no sudoeste dos estados unidos, México e América do Sul (Nelson, 2006). Segundo Reis et al. (2003), há um grande número de espécies presente na América Central e América do Sul.

Normalmente, a ordem dos Characiformes contempla peixes carnívoros e com dentes bem desenvolvidos. O corpo quase sempre é bem dimensionado, com a nadadeira adiposa geralmente presente e escamas ctenoides ou semelhante em alguns. Nadadeira pélvica (com 5-12 raios) e nadadeira anal curta a moderadamente longa (Nelson, 2006; Helfman et al., 2009) também são características marcantes.

2.2. Família Hemiodontidae

A família Hemiodontidae é composta por cinco gêneros e aproximadamente 37 espécies. O nome da família significa meia denteição, pois a maioria das espécies não possui dentes no maxilar inferior; possui uma boca subterminal. Estes peixes são encontrados em água doce tropical, presente na América do Sul, na bacia amazônica e de Orinoco, os rios da Guiana, Suriname e Guiana Francesa, e sul do Paraná e Paraguai (Roberts, 1974; Langeani 1998). Algumas espécies ocorrem em altitudes superiores a 1000 metros em riachos andinos (Géry, 1977; Berra, 2007).

Os peixes presentes nesta família também são conhecidos como nadadores velozes, por possuir um corpo fusiforme e aerodinâmico. O adulto tem seu tamanho variando entre sete e cerca de 30 cm de comprimento. Uma pálpebra bem desenvolvida, um sulco suprapectoral e 9-11 raios da nadadeira pélvica ramificadas são algumas das sinapomorfias que unem todas as espécies dentro de Hemiodontidae (Langeani, 1998). Muitos membros se diferem de outros Characiformes por apresentarem no meio do seu corpo uma mancha redonda na vertical do corpo, na parte posterior da base da nadadeira dorsal, e uma faixa longitudinal no lobo inferior da nadadeira caudal (Langeani, 2003).

2.3. *Hemiodus orthonops* (Eigenmanne Kennedy, 1903)

Esta espécie apresenta no máximo 25 cm de comprimento (Figura 1). É encontrada na América do Sul, bacia do rio Paraguai e do rio Paraná. É comumente conhecida no Brasil como bananinha, piau-banana e piava-banana (Langeani, 2003) e sua alimentação é quase estritamente herbívora (Resende et al., 1998).

Esta espécie possui distribuição natural na parte baixa do rio Paraná, mas tem surgido também na parte alta do rio Paraná, fato considerado incerto pelos pesquisadores (Junior, 2009). Desta forma, o estudo da variabilidade genética desta espécie invasora é de grande importância para futuros estudos relacionados aos possíveis impactos que a invasão desta espécie possa ter causado no Alto rio Paraná, assim como o conhecimento de sua adaptabilidade.



Figura 1 - *Hemiodus orthonops* (comprimento padrão 22,0 cm).

2.4. Família Anostomidae

A família Anostomidae é composta por aproximadamente 10 gêneros e 105 espécies de peixes de água doce encontrados na América do Sul. Sua ocorrência se dá principalmente nos rios de Magdalena, Orinoco, Amazonas, São Francisco, Paraguai, Paraná e Salado. Os gêneros mais representativos são *Leporinus*, com 87 espécies e *Schizodon* com 14 espécies (Eigenmann & Eigenmann, 1891; Vari, 1983; Vari e Williams, 1987, Garavello e Britski, 2003).

Alguns representantes desta família apresentam o corpo alongado e redondo em corte transversal, com uma mandíbula pequena e uma única fileira de dentes em cada maxila. Sua pré-maxila é ampliada e os dentes são curvados.

Muitas espécies são bonitas, pequenas e coloridas e são populares para o uso em aquário (Berra, 2007).

O nome comum, piauí, deriva do fato de que algumas espécies orientam o eixo longo de seus corpos indiretamente cerca de 25 a 30 graus para o fundo com a cabeça para baixo. Por apresentar esta projeção em sua cabeça, estas espécies acabam se alimentando de pequenos organismos e caules verticais de plantas, pois suas bocas pequenas se abrem dorsalmente. A maioria das espécies é herbívora e detritívora (Berra, 2007).

Devido à sua migração, estas espécies de peixes são exploradas comercialmente e utilizadas na pesca de subsistência como um importante item alimentar para as pessoas da América do Sul (Garavello e Bristski, 2003).

2.5. *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1850) e *Leporinus friderici* (Bloch, 1794)

A espécie *Leporinus elongatus* ocorre na América do Sul, bacias do Paraná, La Plata e São Francisco. Seus nomes comuns são: boga, na Argentina, e piapara, no Brasil (Garavello e Bristski, 2003). Segundo Durães et al. (2001), esta espécie possui um hábito alimentar do tipo generalista, influenciado principalmente pela disponibilidade de alimentos no ambiente (Figura 2).

Encontrada nos mercados e feiras livres em várias partes do país, a espécie *Leporinus elongatus* é de grande porte, podendo atingir 60 cm (Baldisserotto e Gomes, 2010). Apesar da grande importância econômica de *L. elongatus* (piapara), da sua capacidade migratória e de sua ampla distribuição em toda a bacia do rio Paraná, a quantidade de indivíduos coletados nos últimos anos vêm diminuindo (Informação pessoal de pescadores de Guaíra, estado do Paraná, Brasil), provavelmente devido a alterações de habitat.

Surpreendentemente, há poucas informações disponíveis sobre a diversidade genética das populações naturais desta espécie (Chiari e Sodré, 1999; Chiari e Sodré, 2001; Martins et al., 2003; Gomes et al., 2008; Oliveira, 2012; Ramos et al., 2012), mesmo que esses dados possam ser críticos para a sua sobrevivência e conserva o. Desde que *L. elongatus* passou a representar um recurso pesqueiro, este passou também a ser considerado ameaçado de extin o.   uma espécie promissora para ser cultivada em fazendas de peixes e, com isso, uma cuidadosa

seleção de populações selvagens apropriadas, com base em critérios genéticos, pode oferecer maior possibilidade de sucesso em programas de recuperação de espécies, manutenção e suporte para as atividades da aquicultura, visando ao aumento da produção de peixes (Martins et al., 2003).



Figura 2 - *Leporinus elongatus* (comprimento padrão 20,7 cm).

A espécie *Leporinus friderici* é encontrada na América do sul, sobretudo, nos rios da bacia do Suriname e Amazonas. Está presente no Brasil, Guiana francesa, Guiana, Suriname, Trinidad e Tobago. Seu nome comum é piau três pintas. (Garavello e Bristski, 2003) (Figura 3).



Figura 3 - *Leporinus friderici* (comprimento padrão 21,2 cm).

O *Leporinus friderici* é um peixe que ultrapassa 45 cm de comprimento e apresenta hábito alimentar onívoro, ingerindo alimentos de origem vegetal e animal

(Chiari e Sodré, 1999; Chiari e Sodré, 2001; Resende, 2003; Baldisserotto e Gomes, 2010).

2.6. Eletroforese de isoenzimas

A eletroforese é uma técnica que possibilita a detecção de mutações que alteram a estrutura das enzimas, a qual passa a ter múltiplas formas moleculares, modificando, assim, sua mobilidade eletroforética, mas mantendo suas atividades catalíticas (Pires, 1983). O termo isoenzima foi proposto por Market e Moller (1959) e é utilizado até hoje para designar enzimas que possuem diferentes formas moleculares com a mesma especificidade de substrato. De acordo com a Enzyme Commission for the International Union of Biochemistry, o termo isoenzima” deveria ser limitado às formas diferentes que surgissem por modificações da estrutura primária das proteínas e o termo formas múltiplas seria mais abrangente, incluindo todas as formas moleculares de uma proteína com a mesma atividade enzimática. O termo aloenzima foi instituído para designar as proteínas variantes, produzidas por diferentes alelos de um mesmo loco (Gottlieb, 1971).

A diferença entre isoenzima de aloenzima pode ser observada por meio de procedimentos simples. Se, ao adicionar um corante específico em um substrato, onde se procedeu a uma corrida eletroforética, ocorrer o surgimento de um número de bandas, essas são chamadas de isoenzimas. Quando algumas destas bandas são identificadas como produtos de diferentes alelos de um mesmo loco, passam a ser chamadas de aloenzimas.

Por meio da migração eletroforética das cadeias polipeptídicas (isoenzimas), quando submetidas a um campo elétrico, é possível verificar a variação dentro e entre espécies. Essa variação ocorre com a substituição de um aminoácido na cadeia polipeptídica que altera seu ponto isoelétrico, bem como sua massa molecular, tornando a migração diferente, quando exposta à corrente elétrica, em suportes porosos e tampões apropriados. Esses suportes são géis que constituem o meio pelo qual as isoenzimas passam durante a migração eletroforética (Alfenas, 2006; Torres et al., 2004; Smithies, 1955), e podem ser de amido, de acetato de celulose ou de poliacrilamida. Após a migração no gel, as enzimas escolhidas são reveladas por meio de soluções específicas em métodos histoquímicos apropriados

para cada enzima especificamente (Hunter e Markert, 1957; Shaw e Prasad, 1970; Harris e Hopkinson, 1976; Richardson et al., 1986).

A técnica genética bioquímica tem sido utilizada por muitos pesquisadores para resolver questões relativas ao modo de especiação em peixes de água doce ou ao status sistemático de populações diferentes. Segundo Toledo et al. (1992), a eletroforese de proteínas é uma das técnicas mais eficientes para a análise genética de populações de peixes e, desta forma, é a mais aconselhada para o monitoramento de estoques pesqueiros em projetos de repovoamento, distinção de espécies em ambientes naturais e filogenia. Abrange aplicações intraespecíficas, como estrutura de populações, endocruzamento, dispersão, limites de espécies e genética ecológica; e também aplicações interespecíficas, como filogenia, modos de especiação, paleobiogeografia, taxas de evolução e hibridação (Murphy et al., 1996).

Uma das vantagens da eletroforese é que as isoenzimas são codominantes, evidenciando que os indivíduos heterozigotos possuem fenótipo diferente dos homozigotos. A identificação dos homozigotos e heterozigotos pode ser usada para comparar populações. Além disso, os estudos bioquímicos usando a eletroforese de proteínas apresentam a vantagem de que a molécula tem origem genética conhecida; normalmente é o produto direto de um único loco e em quase todos os casos a estrutura molecular é determinada e provavelmente livre de modificações ambientais (Thorpe e Solé-Cava, 1994). Uma das limitações da técnica de eletroforese de enzimas está na disponibilidade de tecidos frescos ou congelados, pois as enzimas são degradadas rapidamente após a morte do organismo. (Thorpe e Solé-Cava, 1994).

2.7. Variabilidade genética em populações naturais e a importância de sua conservação

A variabilidade genética é de fundamental importância para manutenção das populações naturais. Geralmente, estas possuem níveis mais elevados de variabilidade genética, pois, com baixa variabilidade genética, que ocorre devido a fatores como endogamia e redução na reprodução, o valor adaptativo das populações naturais diminuiu, colocando-as em risco de extinção. (Agostinho et al., 1999; Nevo, 1978; Solé-Cava e Thorpe, 1991). Essa variabilidade pode ser explicada para os peixes, pelo fato de representarem um grupo de animais primitivos

altamente heterogêneos, submetido a processos evolutivos em diferentes direções. Kirpichnikov (1981); Bush et al. (1977) e Lande (1979) relatam que a alta variabilidade está relacionada ao padrão de distribuição geográfica, uma vez que o isolamento das bacias hidrográficas, com a conseqüente formação de populações alopátricas, favorece o processo de especiação alopátrica.

A variação genética é introduzida nas populações por mutação e migração de novos indivíduos e pode ser perdida pela deriva genética, endocruzamentos e, no caso de genes não neutros, pela maior parte dos tipos de seleção natural (Nei, 1987). Sendo assim, conservá-la é indispensável para a permanência da espécie. Existem outros aspectos, como a variação ambiental, que pode influenciar na permanência das espécies (Villa e Caramaschi, 2008), e a variabilidade genética, que contribui para assegurar a evolução e adaptação de tais aspectos (Ridley, 2006).

A variabilidade genética é a ligeira diferença na sequência de nucleotídeos em um loco de uma molécula de DNA, diferença esta que pode alterar a formação de uma proteína por outra e, assim, ocasionar diferenças bioquímicas, morfológicas ou até mesmo comportamentais no indivíduo. Assim, a variabilidade genética pode ser quantificada por meio das frequências gênicas obtidas com a análise de isoenzimas. Pode-se considerar que os locos analisados representam uma amostra aleatória do genoma e, dessa maneira, seria representativa da população (Solferini e Selivon, 2001).

Sendo a variabilidade genética a herança evolutiva de uma espécie, o conhecimento e a manutenção da integridade genética de subunidades populacionais ou populações locais constituem importantes aspectos em programas de preservação e manejo da espécie. A perda da biodiversidade em ambientes aquáticos está entre os mais sérios problemas enfrentados pelos países do mundo (Moyle e Leidy, 1992). Diante disso, podemos verificar que as técnicas genéticas moleculares estão se tornando cada vez mais úteis, em especial com relação aos dados obtidos pela análise de aloenzimas. Dados de grande importância contribuem para várias áreas da biologia, pois representam o conhecimento básico da variabilidade genética e podem contribuir ativamente para a conservação de diferentes espécies de peixes de nossa fauna.

2.8. Estudos de variabilidade genética de populações naturais de peixes brasileiros com isoenzimas

Atualmente, várias técnicas têm sido utilizadas no estudo de variabilidade genética de peixes, devido ao avanço tecnológico que ocorreu na área da biologia molecular. (Hilsdorf et al., 2006). A técnica de eletroforese de isoenzimas tem ajudado muito na interpretação da variabilidade genética e da consequente discriminação nas espécies de peixes. A variabilidade genética de populações naturais pode ser quantificada por meio de frequências de genes e genótipos obtidos a partir da análise de isoenzimas, que são transformados em uma série de índices, que, por sua vez, são interpretados como indicadores de estrutura populacional (Solferini e Selivon, 2001)

Por meio da análise de isoenzimas, é possível identificar novas espécies. Zawadzki et al. (2004) utilizaram esta técnica em um estudo comparativo entre duas populações: *Neoplecostomus sp.*, com a presença de nadadeira adiposa, pertencente ao Rio Corumbá, bacia do Rio Paraná, e a *Neoplecostomus paranensis*, pertencente ao Rio Paranapanema e caracterizada pela ausência ou redução da nadadeira adiposa. Neste trabalho, ficou constatado que as duas espécies são morfologicamente semelhantes e, apesar da evidente nadadeira adiposa, pode-se questionar a validade dessa característica como meio de separação dessas espécies em espécies distintas. No estudo, foram encontrados seis locos de diagnóstico: *Acp-A*, *Adh-A*, *Est-A*, *Igp-A*, *Ldh-A* e *Ldh-B*. O loco *Gpi-B* mostrou diferenças significativas entre as frequências alélicas para as duas amostras. A Identidade genética de Nei entre as populações foi de 0,731 e a divergência genética foi expressiva. Assim verificou-se que a amostra do Rio Corumbá é diferente de *N. paranensis* e provavelmente representa uma nova espécie.

Philippsen et al. (2009) compararam 4 populações de *Neoplecostomus yapo*, duas pertencentes ao ribeirão Atlântico e ribeirão Uraí e as outras duas ao rio Verde e rio Fortaleza. Neste trabalho, verificaram que as quatro populações são geneticamente muito semelhantes entre si e que há excesso de homozigotos nos locos polimórficos.

Reusing et al. (2011) também compararam duas populações do gênero *Neoplecostomus* da bacia do rio Paraná. Amostras de *Neoplecostomus sp. 1* foram coletadas em fluxo Paraitinguinha da bacia do rio Tietê, município de Salesópolis, estado de São Paulo, e os de *Neoplecostomus sp. 2*, a partir de fluxo de São

Domingos, bacia do Rio Grande, município de Muzambinho, Minas Gerais. Os pesquisadores analisaram 12 sistemas enzimáticos. Os valores de heterozigidade esperada de Nei foram considerados abaixo da média para populações de peixes de água doce. A proporção de locos polimórficos foi baixa (apenas 5,26% para o loco *ldh*). A baixa frequência de heterozigotos para ambas as populações revelou uma alta fixação de alelos para cada loco e o excesso de homozigotos foi observado em ambas as populações. Os valores de identidade genética de Nei e a presença de locos com diferentes frequências de alelos em ambas as populações podem indicar que as duas populações pertencem a espécies diferentes.

Por meio das frequências gênicas obtidas pela análise de isoenzimas, é possível também quantificar a variabilidade genética de uma população. Peres et al. (2005) estudaram a variabilidade genética de duas populações de *Astyanax altiparanae*, uma das espécies mais abundantes da bacia do alto rio Paraná e que representam uma importante fonte de alimento para muitas espécies de peixes piscívoros comercializados. Um total de 13 enzimas foram analisadas, reportando um total de 52,38% da proporção de locos polimórficos para a população do alto rio Paraná e 38,10% para a população do ribeirão Ficha. O cálculo da variabilidade genética indicou um valor de heterozigidade de 0,1518 em *A. altiparanae* do alto rio Paraná e 0,0905 para aqueles do ribeirão Ficha. Os dados mostraram que as duas populações são geneticamente diferentes e apresentaram um alto grau de variabilidade genética. Estes dados são de grande importância, pois representam o conhecimento básico da variabilidade genética destes peixes e poderão contribuir para sua conservação.

Vários autores estudam a caracterização das espécies naturais da bacia do rio Paraná com o intuito de fornecer dados referentes à sua genética para contribuir com o banco de dados destas espécies, para assim auxiliar em possíveis estudos mais detalhados a respeito desta (Rezende, et al., 2009; Renesto, et al., 2001; Ito, et al., 2009; Renesto, 2000; Renesto, et al., 2007).

Revaldaves et al. (1997) realizaram um estudo com importantes implicações para o manejo de pesca, piscicultura e conservação dos estoques de *Prochilodus lineatus* (curimba ou curimbatá). Três subpopulações desta espécie foram coletadas na bacia do rio Paraná (rios Paraná, Baía e Ivinheima) e 12 sistemas enzimáticos puderam ser analisados. Dezoito locos foram identificados e seis deles apresentaram polimorfismo (*Est-1**, *Est-2**, *Idh-1**, *Pgm-1**, *Pgm-2** e *Ldh-2**),

indicando um alto valor de heterozigosidade média (13%). Os valores da identidade (0,99) e distância genética ($\leq 0,004$) sugeriram que as três subpopulações analisadas representavam uma única unidade reprodutiva com alto fluxo gênico.

No sul da costa brasileira, duas populações de Perciformes (*Cynoscion jamaicensis* e *Cynoscion striatus*) foram analisadas por de onze sistemas enzimáticos. A presença de cinco locos diagnósticos (*Aat-1**, *Aat-2**, *Adh-1**, *Hbdh-2** e *Mep-1**), dentre os 16 encontrados, e o valor de I (0,68) confirmaram os dados morfológicos de que as duas espécies pertencem ao mesmo gênero (Levy e Cassano, 1994).

Levy et al. (1998) estudaram 17 enzimas e uma proteína não específica de sete populações de *Micropogonias furnieri* (Sciaenidae) ao longo das latitudes 23°S e 33°S (sul e sudeste) da costa brasileira. Características morfológicas e da dinâmica dos exemplares desta região sugeriram a presença de um isolamento parcial entre as populações. No entanto, os dados de isoenzimas revelaram um alto grau de homogeneidade das frequências alélicas ($F_{st} = 0,005$), não corroborando esta hipótese de isolamento parcial entre as populações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de coleta

Foram utilizados exemplares de *Leporinus elongatus*, *Leporinus friderici* e *Hemiodus orthonops* da ordem Characiformes. As duas primeiras espécies foram coletadas no rio Paraná, município de Marilena, enquanto a espécie *H. orthonops* foi coletada em duas regiões diferentes da bacia do rio Paraná, no município de Marilena e Alto Paraná (Figura 1), a 23°21'27.87"S e 53°44'54.14"W, no município de Marilena, e a 23°23'43.93"S e 53°48'47.79"W, município de Alto Paraíso (Figura 1).

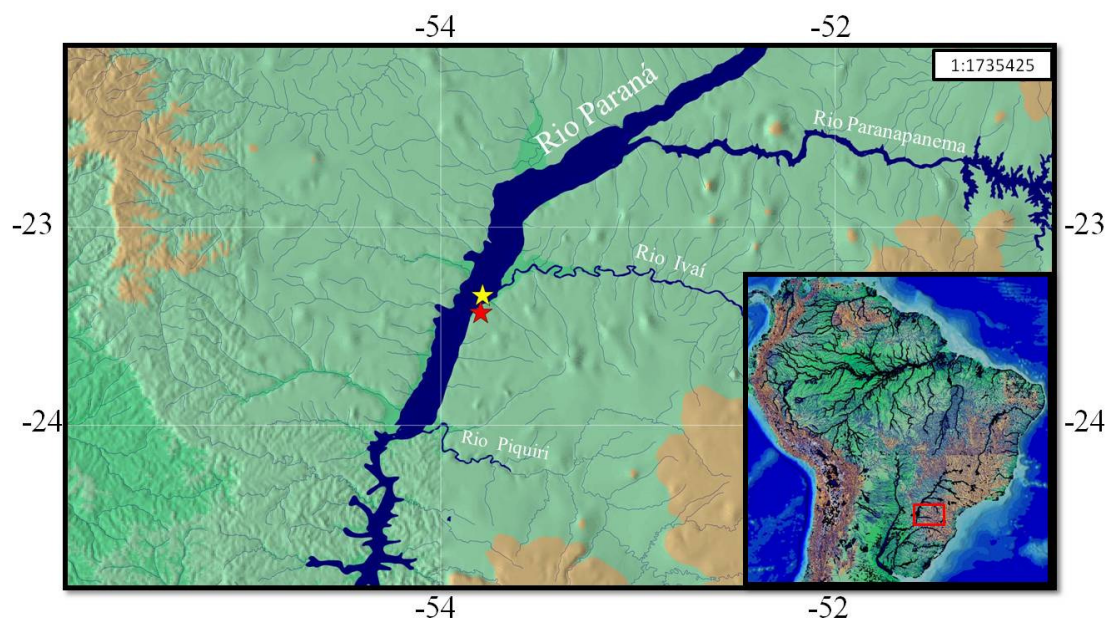


Figura 4 - Mapa hidrográfico do estado do Paraná. Pontos de coleta no rio Paraná. Estrela amarela = município de Marilena 23° 21'27.87" S e 53 ° 44'54.14"W estrela vermelha= município de Alto Paraíso 23°23'43.93"S e 53 ° 48'47.79"W.

3.2. Coleta e armazenagem

As coletas foram realizadas no período de maio de 2012 a abril de 2013 e resultaram na captura de 57 exemplares, sendo 15 de *Hemiodus orthonops*, 15 de *Leporinus elongatus*, 14 de *Leporinus friderici*, presentes na primeira localidade. No segundo local de coleta, foram coletados 13 exemplares de *Hemiodus orthonops*. Todos os exemplares foram congelados e conservados em baixa temperatura (-0°C) até a extração das enzimas. Os espécimes testemunho foram depositados na

coleção do Nupélia (Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura), da Universidade Estadual de Maringá.

3.3. Eletroforese em gel de amido

As amostras dos tecidos muscular estriado esquelético, de fígado e de coração foram homogeneizadas com bastão de vidros em tubos de propileno (1,5 mL) com 100 µL de tampão Tris-HCl 0,02M, pH 7,5. As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4º C e 16434.6g. O extrato protéico foi aplicado no gel de amido de milho (penetrose 50 (Val et al., 1981) a 17%, com pequenas tiras de papel-filtro (4 mm x 8 mm) Whatman 3MM® embebidas com as amostras e, em seguida, foi submetido à eletroforese horizontal contínua, sob refrigeração. Três soluções tampão foram utilizadas: Tris Fosfato 0,35M/ Ácido Citrico 0,043M, pH 5,9 (TFC), diluído 15 vezes na preparação do gel; Tris 0,1 M/Ácido Maleico 0,1M/ EDTA 0,01M/Cloreto de Magnésio 0,01M (TEM) na cuba e diluída 10 vezes no gel e Tris 0,18M/Ácido bórico 0,1M/EDTA 0,004M, pH 8,6 (TBE), diluído 4 vezes na preparação do gel.

As corridas eletroforéticas duraram 17 horas, sob uma corrente elétrica de aproximadamente 50 V nas extremidades do gel. Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado horizontalmente em duas fatias, as quais foram incubadas com soluções histoquímicas específicas, necessárias para a revelação das bandas de atividade enzimática de cada sistema e preparadas segundo protocolo de Murphy et al. (1996).

Após incubação em estufa com ausência de luz, à temperatura de 37°C, até a visualização das bandas nos géis, estes permaneceram em uma solução conservante constituída de Metanol/água/ácido acético na proporção de 5:5:1, por 24 horas e em seguida fotografados e analisados.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado entre duas placas de vidro vertical, sendo constituído de dois sistemas de géis com diferentes porosidades e pH. O gel separador de visualização estava com concentração de 10% de acrilamida-bisacrilamida e o gel de empilhamento ou concentrador a 5% (Quadro 2).

Quadro 1 - Componentes do gel de poliacrilamida

Componentes	Gel de separação	Gel de empilhamento
Solução acrilamida-bisacrilamida	5, ml	3 ml
Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	4 ml	—
Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	—	3 ml
Água destilada	6,7 ml	30 μ l
Persulfato de amônia	320 μ l	250 μ l
TEMED (Tetrametilenodiamina)	15,8 μ l	3 μ l

As amostras de músculo foram preparadas conforme já descrito no protocolo para o gel de amido, mas o tampão utilizado para macerar foi o Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, com 10% de glicerol, e centrifugadas, por 20 minutos, a 4°C e 16434.6g. Uma pequena alíquota do sobrenadante (20 μ l) foi aplicada no gel, já polimerizado, com o auxílio de uma micropipeta, e submetida à eletroforese em cuba vertical sob refrigeração, utilizando o tampão Tris-Glicina na cuba (sistema de eletroforese descontínuo). Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2 por 30 minutos. Em seguida, foi adicionada a solução corante para revelar a enzima esterase (Alfenas et al., 1991) e acondicionado em câmara escura.

3.5. Análise das isoenzimas

Os 10 sistemas enzimáticos analisados em gel de amido e um em poliacrilamida estão descritos no Quadro 1. A nomenclatura das enzimas utilizadas foi proposta pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Webb, 1992). A interpretação genética dos zimogramas foi baseada na estrutura quaternária das enzimas, (Ward et al., 1992).

Os dados foram analisados no programa Popgene 3.1 (Yeh, 1997). A variabilidade genética foi estimada pelo cálculo da heterozigosidade (H_e e H_o) de acordo com Nei (1978). Com os valores das frequências alélicas, a identidade (I) e a distância genética (D) de Nei (1978) foram calculadas e, a partir desta última, foi construído um dendrograma (método de agrupamento pelo algoritmo UPGMA – Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means) das populações estudadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela técnica de eletroforese de gel de amido, foram analisados 11 sistemas enzimáticos (Quadro 1) em 56 espécimes de 3 espécies de peixes da ordem Characiformes, sendo 28 indivíduos da espécie *Hemiodus orthonops*, 15 indivíduos da espécie *Leporinus elongatus* e 14 indivíduos da espécie *Leporinus friderici*, nos quais foram detectados 23 locos em um total de 63 alelos.

Foram detectados 27 alelos em *H. orthonops*, de Marilena, distribuídos em 21 locos, dos quais 6 locos se apresentaram polimórficos (*Adh*, *G6pdh*, *Ldh-1*, *Est-2*, *Est-4*, *Est-5*). Em Alto Paraíso, foram detectados 25 alelos distribuídos em 21 locos, dos quais 3 locos foram polimórficos (*Adh*, *Est-2*, *Est-5*). A espécie *L. elongatus* apresentou 34 alelos em 22 locos, dos quais sete locos foram polimórficos (*Gpi-1*, *Gpi-2*, *Idh-2*, *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-5*). Em *L. friderici*, foram detectados 34 alelos em 22 locos, dos quais nove locos foram polimórficos (*Gpi-1*, *Gpi-2*, *Idh-1*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Pgm-1*, *Est-1*, *Est-2*, *Est-5*).

O Quadro 1 mostra as frequências alélicas de cada loco de cada espécie. A enzima Aspartato amino transferase (AAT) apresentou dois locos: *Aat-1*, que codifica as enzimas catódicas; e *Aat-2* que codifica as enzimas anódicas. O loco *Aat-1* foi monomórfico para as 4 populações com o mesmo alelo para todas. O loco *Aat-2* foi monomórfico para as quatro populações, apresentando alelos diferentes para três populações, entre as quais duas populações de *H. orthonops* apresentaram alelos iguais, diferindo de *L. elongatus* e *L. friderici*.

A enzima ADH foi expressa com 1 loco, com 2 alelos para as duas populações de *H. orthonops*, estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nas populações de *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici*, a enzima expressou apenas um loco monomórfico fixado para alelos diferentes.

O sistema enzimático G3PDH apresentou-se codificado por dois locos *G3pdh-1* e *G3pdh-2*, ambos monomórficos para todas as populações, diferentemente do encontrado por Renno et al. (1989, 1990), que observaram 4 locos para *L. friderici* e 3 locos para *L. elongatus*.

A enzima G6PDH apresentou 1 loco polimórfico para a espécie de *H. orthonops* da região de Marilena, estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para *H. orthonops*, de Alto Paraíso, e *L. elongatus*, de Marilena, a enzima apresentou 1 loco monomórfico. A população de *L. friderici*, de Marilena, expressou da enzima.

Dois locos para a enzima GPI foram detectados: *Gpi-1* monomórfico para a espécie de *H. orthonops* das duas regiões; e polimórfico, com a presença de três alelos na espécie *L. elongatus* e quatro alelos na espécie *L. friderici*, sendo o alelo *Gpi-1(d)* exclusivo para esta espécie. Os locos polimórficos de GPI estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. *Gpi-2* foi monomórfico para a espécie de *H. orthonops* das duas regiões e foi polimórfico com a presença de 3 alelos em *L. elongatus* sendo *Gpi-2(c)* exclusivo para esta espécie, e 2 em *L. friderici* estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A enzima IDH apresentou 2 locos *Idh-1* e *Idh-2*. As populações 1 e 2 de *H. orthonops* e *L. elongatus* foram monomórficas para *Idh-1* e *L. friderici* foi polimórfico, com a presença de 2 alelos em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Dois locos foram observados para LDH: *Ldh-1* e *Ldh-2*. *Ldh-1* foi monomórfico para a *H. orthonops* de Alto Paraíso e para a população *L. elongatus*. Já para *H. orthonops* e *L. friderici* da região de Marilena foi polimórfico com a presença de 2 alelos em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes dados corroboram os resultados obtidos por Chiari e Sodré (1999), que detectaram 2 locos: monomórficos para *L. elongatus* e polimórficos para *L. friderici*.

Na enzima Malato Desidrogenase (MDH) foram expressos 3 locos, todos monomórficos nas 4 populações.

Dois locos para a Enzima M lica (ME) foram observados: *Me-1* e *Me-2*, os quais não apresentaram varia o, embora houvesse varia o dos alelos entre as espécies.

Para a izoenzima Fosfoglucomutase (PGM), foi detectado um loco: *Pgm-1* que se expressou nas quatro popula es. Para *H. orthonops* das duas regiões não houve varia o e, nas popula es de *L. elongatus* e *L. friderici*, foram polimórficos, estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Corroborando a maioria dos estudos feitos com peixes que descreve apenas um loco, como observado por Renno et al. (1989) para as quatro espécies de *Leporinus*, porém discordando de Chiari e Sodré (1999), cujos estudos detectaram 3 locos para PGM.

Para a enzima Esterase (EST), foram encontrados 5 locos. O loco *Est-1* foi expresso apenas nas popula es de *L. elongatus* e *L. friderici*, sendo ambas foram, polimórficas com a presença de dois alelos. *Est-2* foi polimórfico em todas as popula es e *H. orthonops* das duas regiões apresentaram 2 alelos, *L. elongatus* 4 alelos e *L. friderici* 3 alelos. *Est-3* foi expresso apenas em *L. elongatus*, que foi

polimórfico com 2 alelos; e *L. friderici* monomórfico. O loco *Est-4* foi polimórfico (2 alelos) para *Hemiodus orthonops* da região de Marilena e para as demais populações foi monomórfico. *Est-5* foi expresso em todas as populações, sendo polimórfico apenas *H. orthonops* da região de Alto Paraíso, com 3 alelos, e as demais polimórficas com 2 alelos.

Quadro 2 - Frequência dos Alelos nas amostras de *Hemiodus orthonops*, *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici*. Amostras de *H. orthonops* (HO(1)), *L. elongatus* (LE) e *L. friderici* (LF) do município Marilena no estado do Paraná. Amostra de *H. orthonops* (HO(2)) do município de Alto Paraíso estado do Paraná

Loco	Alelo	HO(1)	HO(2)	LE	LF
<i>Aat-1</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Aat-2</i>	<i>a</i>				
	<i>b</i>			1,0000	
	<i>c</i>				1,0000
	<i>d</i>	1,0000	1,0000		
<i>Adh</i>	<i>a</i>	0,5385	0,5000		
	<i>b</i>	0,4615	0,5000	1,0000	
	<i>c</i>				1,0000
<i>G3pd-1</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000		
	<i>b</i>			1,0000	
	<i>c</i>				1,0000
<i>G3pd-2</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000		
	<i>b</i>			1,0000	
	<i>c</i>				1,0000
<i>G6pdh</i>	<i>a</i>	0,3750	1,0000		
	<i>b</i>	0,6250		1,0000	
<i>Gpi-1</i>	<i>a</i>			0,0667	0,2308
	<i>b</i>	1,0000	1,0000	0,9000	0,0769
	<i>c</i>			0,0333	0,4231
	<i>d</i>				0,2692
<i>Gpi-2</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000	0,3667	0,0714
	<i>b</i>			0,5333	0,9286
	<i>c</i>			0,1000	
<i>ldh-1</i>	<i>a</i>				0,0714
	<i>b</i>	1,0000	1,0000	1,0000	0,9286
<i>ldh-2</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000	0,1786	
	<i>b</i>			0,8214	1,0000

Quadro 2, cont.

<i>Ldh-1</i>	<i>a</i>	0,9615	1,0000		0,1429
	<i>b</i>			1,0000	
	<i>c</i>	0,0385			0,8571
<i>Ldh-2</i>	<i>a</i>			1,0000	0,3571
	<i>b</i>	1,0000	1,0000		0,6429
<i>Mdh-1</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000		
	<i>b</i>			1,0000	1,0000
<i>Mdh-2</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000		
	<i>b</i>			1,0000	1,0000
<i>Mdh-3</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000		
	<i>b</i>				1,0000
<i>Me-1</i>	<i>a</i>			1,0000	
	<i>b</i>	1,0000	1,0000		
	<i>c</i>				
	<i>d</i>				1,0000
<i>Me-2</i>	<i>a</i>			1,0000	
	<i>b</i>	1,0000	1,0000		
	<i>c</i>				1,0000
<i>Pgm-1</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000		
	<i>b</i>				0,5000
	<i>c</i>			0,4000	
	<i>d</i>			0,6000	
	<i>e</i>				0,5000
<i>Est-1</i>	<i>a</i>			0,7333	0,9643
	<i>b</i>			0,2667	0,0357
<i>Est-2</i>	<i>a</i>	0,1538	0,0769	0,2333	0,4286
	<i>b</i>	0,8462	0,9231	0,4333	0,3929
	<i>c</i>			0,3000	0,1786
	<i>d</i>			0,0333	
<i>Est-3</i>	<i>a</i>			0,2000	1,0000
	<i>b</i>			0,8000	
<i>Est-4</i>	<i>a</i>	0,4000	1,0000	1,0000	1,0000
	<i>b</i>	0,6000			
<i>Est-5</i>	<i>a</i>	0,2308	0,0385		0,5357
	<i>b</i>	0,7692	0,5385	0,0333	0,4643
	<i>c</i>		0,4231	0,9667	

O Quadro 2 mostra uma síntese dos resultados de variabilidade genética para as 4 populações. Pelos dados apresentados, pode-se verificar que a população de *H. orthonops* da região de Alto Paraíso teve uma proporção de locos polimórficos de 13,04%, com apenas três locos foram polimórficos.

Nas outras três populações, foi encontrada uma proporção de locos polimórficos de 26,09% para *H. orthonops*, da região de Marilena; 34,78% para *L.*

elongatus e 39,13% para *L. friderici*. Chiari e Sodré (1999), analisando sete sistemas enzimáticos, determinaram a propor o de locos polimórficos de 36,8% para *L. friderici* e 27,8% para *L. elongatus*. Os mesmos autores, em 2001, utilizando o marcador Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) identificaram a propor o de locos polimórficos de 67,4 % para *L. elongatus*, do baixo rio Tibagi, e 46,3% para *L. friderici*. Os dados obtidos por meio da quantifica o da variabilidade genética por meio do RAPD são comparáveis com os dados obtidos por isoenzimas para estas espécies.

Quadro 3 - Medidas de variabilidade genética nas amostras de *Hemiodus orthonops*, *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici*. Amostras de *H. orthonops*, *L. elongatus* e *L. friderici* do município Marilena, Paraná. Amostra de *H. orthonops* do município de Alto Paraíso, Paraná

Popula�o	He \pm DP	Ho \pm DP	P%	K \pm DP
HO(1)	0,1061 \pm 0,1925	0,0668 \pm 0,1683	26,09 %	1,286 \pm 0,4629
HO(2)	0,0580 \pm 0,1620	0,0330 \pm 0,1206	13,04 %	1,191 \pm 0,5118
LE	0,1397 \pm 0,2234	0,0829 \pm 0,1701	34,78 %	1,546 \pm 0,8579
LF	0,1514 \pm 0,2415	0,1476 \pm 0,2569	39,13 %	1,522 \pm 0,7903

He: heterozigidade esperada; Ho: heretozigidade observada; P%: propor o dos locos polimórficos; K: número de alelos por loco.

Levando em considera o os mesmos 11 sistemas enzimáticos analisados no presente trabalho, a média de He foi de 0,0580 na espécie *H. orthonops*, da região de Alto Paraíso, um pouco maior que 0,051 estimada por Ward et al. (1992) para 195 espécies de peixes. Para a espécie *H. orthonops* da popula o 1, a He média foi de 0,1061, média acima do valor para espécies de peixes de água doce em geral (Ward et al., 1992). Na espécie *L. elongatus*, o valor de He foi de 0,1397 e em *L. friderici* foi 0,1514, média bem acima do valor médio para espécies de água doce. Os valores de He e Ho estimados no presente trabalho são muito semelhantes aos encontrados por Chiari e Sodré (1999), o que atesta a validade de se usar isoenzimas como medida de variabilidade genética.

O Quadro 4 apresenta os valores de Identidade e distância genética padrão de Nei (1978) entre as quatro popula es estudadas. Os dados demonstram que as três espécies são geneticamente muito distintas entre si. Porém, apesar de as popula es das espécies de *H. orthonops* pertencentes ao município de Marilena e Alto Paraíso serem geneticamente muito parecidas, confirmando assim serem da

mesma espécie, apresentaram diferenças de distância genética confirmadas, por serem populações de regiões diferentes do rio Paraná.

Quadro 4 - Valores de identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1978) para as quatro amostras, *H. orthonops* (1) (Município de Alto Paraíso), *L. elongatus*, *L. friderici*, *H. orthonops* (2) (Município de Marilena).

Pop ID	<i>H. orthonops</i> (1)	<i>L. elongatus</i>	<i>L. friderici</i>	<i>H. othonops</i> (2)
<i>H. orthonops</i> (1)	****	0,2836	0,2172	0,9558
<i>L. elongatus</i>	1,2601	****	0,4141	0,2987
<i>L. friderici</i>	1,5270	0,8816	****	0,2300
<i>H. othonops</i> (2)	0,0452	1,2085	1,4698	****

As estatísticas F de Wright (1965), Fis, Fit e Fst foram utilizadas para as duas populações de *H. orthonops*, com o intuito de averiguar o nível de endogamia e a estrutura populacional. O coeficiente Fit, que expressa a taxa média de endogamia, foi de 0,4917. O valor 0,2081 de Fst representa uma medida de diferenciação das duas populações em função da distância entre elas. Segundo Wright (1978), quando o valor de Fst encontra-se acima de 0,25, pode-se considerar uma grande diferenciação entre as duas populações; valores variando entre 0,15 e 0,05 indicam uma diferenciação moderada; valores abaixo de 0,05 indicam uma diferenciação baixa. Sendo assim, pode-se dizer que o valor obtido demonstra uma grande diferenciação. O coeficiente Fis mede a redução da heterozigosidade devido à reprodução não casual dentro de uma subpopulação e seu valor representa um nível considerável de consanguinidade. Observando o Quadro 4, encontramos um alto coeficiente de endogamia total (Fis: 0,3581) detectado nas populações em estudo, indicando que o efeito preponderante foi gerado pelo sistema reprodutivo (Fit: 0.4917), o que contribuiu para a diferenciação intrapopulacional.

Os dados de distâncias genéticas obtidos resultaram em um dendograma, utilizado para estimar relações genéticas entre as espécies estudadas (Thorpe, e Solé-Cava, 1994). A figura 5 mostra o dendrograma construído pelo método UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic mean). Analisando este dendrograma, podemos observar que as três espécies estão agrupadas em dois conjuntos diferentes, confirmando os dados obtidos no trabalho, que apontam

pequena diferença para a espécie *H. orthonops* 1 e 2, devido às diferentes regiões em que foram coletados.

Quadro 5 – Resumo da estatística F para amostras de *Hemiodus orthonops*, *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici*. Amostras de *Hemiodus orthonops*, *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici* do município Marilena, Paraná. Amostra de *Hemiodus orthonops* do município de Alto Paraíso, Paraná

Loco	N	Fis	Fit	Fst
<i>Aat-1</i>	52	****	****	0,0000
<i>Aat-2</i>	52	****	****	0,0000
<i>Adh</i>	52	-0,1573	-0,1556	0,0015
<i>G3pd-1</i>	52	****	****	0,0000
<i>G3pd-2</i>	52	****	****	0,0000
<i>G6pdh</i>	50	0,4667	0,7091	0,4545
<i>Gpi-1</i>	52	****	****	0,0000
<i>Gpi-2</i>	52	****	****	0,0000
<i>ldh-1</i>	50	****	****	0,0000
<i>ldh-2</i>	52	****	****	0,0000
<i>Ldh-1</i>	52	-0,0400	-0,0196	0,0196
<i>Ldh-2</i>	52	****	****	0,0000
<i>Mdh-1</i>	52	****	****	0,0000
<i>Mdh-2</i>	52	****	****	0,0000
<i>Mdh-3</i>	52	****	****	0,0000
<i>Me-1</i>	52	****	****	0,0000
<i>Me-2</i>	52	****	****	0,0000
<i>Pgm-1</i>	52	****	****	0,0000
<i>Est-1</i>	0	****	****	0,0000
<i>Est-2</i>	52	1,0000	1,0000	0,0145
<i>Est-3</i>	0	****	****	0,0000
<i>Est-4</i>	46	1,0000	1,0000	0,4286
<i>Est-5</i>	52	0,3043	0,392	0,1321
Média	52	0,3581	0,4917	0,2081

(N= tamanho da amostra).

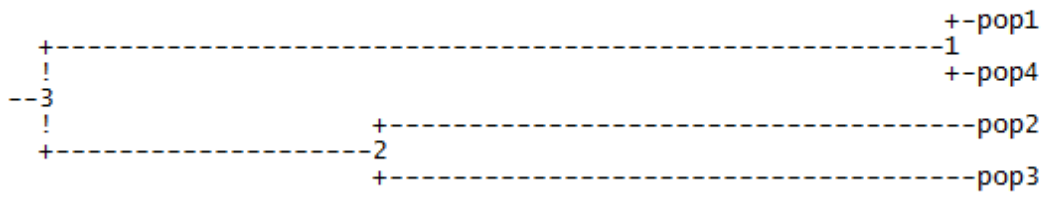


Figura 5 - Dendrograma construído com o algoritmo UPGMA, baseado em distâncias genéticas de Nei (1978). pop1= *H. orthonops* 1, pop2= *L. elongatus*; pop3 = *L. friderici* e pop4 = *H. orthonops* 2.

5. CONCLUSÕES

As análises dos 11 sistemas enzimáticos pela ordem Characiformes permitiram algumas conclusões.

a) As populações amostradas de *H. orthonops*, *L. elongatus* e *L. friderici* apresentaram variabilidade genética superior à média para peixes. Comparada às demais espécies, a variabilidade genética mais baixa foi a da população 2 da espécie *Hemiodus orthonops*.

b) Os valores de identidade genética de Nei evidenciaram que as 3 espécies são muito diferentes entre si. Mostraram também que as duas populações de *Hemiodus orthonops* são semelhantes, mas não iguais geneticamente, confirmando o fato de virem de regiões diferentes.

c) As populações invasoras de *Hemiodus orthonops* apresentam variabilidade genética inferior à de *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELL, R. **Conservation biology for the biodiversity crisis: a freshwater followup.** Conservation Biology, 16:1435-1437, 2005.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I.; JÚLIO JR., H.F. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin. In: CAROLSFIELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.E BAER, A. (eds.). **Migratory fishes of south america: biology, fisheries and conservation status.** Ottawa, Canada: World Fisheries Trust, the World Bank and the International Development Research Centre, 2003. p. 19 - 98.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, HARUMI, I.; JÚLIO JÚNIOR, H.F. Riscos da implantação de cultivos de espécies exóticas em tanques-redes em reservatórios do Rio Iguaçu. **Cadernos da Biodiversidade**, 2:1-9, 1999.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; THOMAZ, S.M.; HAHN, N.S. The upper Paraná river and its floodplain: main characteristics and perspectives for management and conservation. In: THOMAZ, S.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (org.). **The upper Paraná river and its Floodplain: physical aspects, ecology and conservation.** Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 2004. p. 381-393.
- AGOSTINHO, A.A.; JULIO JUNIOR, H.F. Ameaça ecológica: peixes de outras águas. **Ciência Hoje**, 21: 36-440, 1996.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos.** Viçosa: UFV, 2006. 627p.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa: SIF, 1991. 242p.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; DONOLA, E.; FORESTI, F.; GALHARDO, E.; TOLEDO FILHO, S.A. Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. **Cadernos de Ictiogenética**, 1:1-39, 1992.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: Editora UFSM, 2010. 608p.

- BERRA, T.M. **Freshwater fish distribution**. London: Academic Press, 2001. 587p.
- BERRA, T.M. **Freshwater fish distribution**. Chicago: University of Chicago Press, 2007. 606p.
- BUSH, G.L.; CASE, S.M.; WILSON, A.C.; PATTON, J.I. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. **National Academy of Sciences of the United States of America**, 74:3942- 3946, 1977.
- CASAL, C.M.V. Global documentation of fish introductions: the growing crisis and recommendations for action. **Biological Invasions**, 8:3-11, 2006.
- CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Analysis of the genetic variability in five species of the family Anostomidae (Ostariophysi - Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, 22:517-523, 1999.
- CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis. **Acta Scientiarum**, 23:445-451, 2001.
- CUCHEROUSSET, J.; OLDEN, J.D. Ecological impacts of non-native freshwater fishes. **Fisheries**, 36:215-230, 2011.
- DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A.H.; GESSNER, M.O.; KAWABATA, Z.I.; KNOWLER, D.J.; LEVEQUE, C.; NAIMAN, R.J.; PRIEUR-RICHARD, A.H.; SOTO, D.; STIASSNY, M.L.J.; SULLIVAN, C.A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews**, 81:163-182, 2006.
- DURÃES, R.; POMPEU, P.S.; GODINHO, A.A.L. Alimentação de quatro espécies de *Leporinus*(Characiformes, Anostomidae) durante a formação de um reservatório no sudeste do Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, 90:183-191, 2001.
- EIGENMANN, C.H.; EIGENMANN, R.S. **A catalogue of the fresh-water fishes of south america**. Washington: United States National Museum, 1891. 511p.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, D.J.; BRISCOE, A.D. **Fundamentos da genética de conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de genética, 2008. 280p.

GARAVELLO, J.C.; BRITSKI, H.A. Check list of the freshwater fishes of south and Central America. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (eds.). **Family Anostomidae**. Edipucrs: Porto Alegre, 2003. p. 71–84.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune: TFH Publications. 1977. 672p.

GOMES, P.C.; RIBEIRO, R.P.; BARERO, N.L.; POVH, J.A.; VARGAS, L.; SOROL, R.N.; Diversidade genética de três estoques de piapara (*Leporinuselongatus*), utilizando RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 30:241-247, 2008.

GOMIEIRO, L.M.; BRAGA, F.M.S. Diversity of the ichthyofauna in the Serra do Mar State Park – Núcleo Santa Virgínia, São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, 28: 213-218, 2006.

GOTTLIEB, L.D. Gel eletroforesis: new approach to the study of evolution. **Bioscience**, 21:939-44, 1971.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. Amsterdam: North Holland, 1976. 323p.

HELFMAN, G.S.; COLLETTE, B.B.; FACEY, D.E.; BOWEN, B.W. **The diversity of fishes: biology, evolution and ecology**. West Sussex. UK: Wiley-Blackwell, 2009. 720p.

HILSDORF, S.W.A.; RESENDE, K.E.; MARQUES, S.K.D. **Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas**. Londrina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 2006. 43p.

HUBBY, J.L.; LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. Number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, 54:577-594, 1966.

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

ITO, K.F.; RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H. Biochemical comparison of two *Hypostomus* populations (Siluriformes, Loricariidae) from the Atlântico Stream of the upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 32:51-57, 2009.

JÚNIOR, J.F.H.; TÓS, D.C.; AGOSTINHO, A.A.; PAVANELLI, S.C. A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, 7:709-718, 2009.

KIRPICHNIKOV, V.S. Genetic bases of fish selection. Berlin/New York: **Springer Verlag**, 1981. 410p.

KOLAR, C.S.; LODGE, D.M. Progress in invasion biology: predicting invaders. **Trends in Ecology & Evolution**, 16:199-204, 2001.

LANDE, R. Effectives deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. **Evolution**, 33:234-251, 1979.

LANGEANI, F. Family Hemiodontidae (Hemiodontids). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (eds.). **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 96- 100.

LANGEANI, F. Phylogenetic study of the Hemiodontidae (Ostariophysi: Characiformes). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs. 1998. p. 145-160.

LEVY, J.A.; CASSANO, V.P.F. Biochemical-genetic comparison of *Cynoscionjamaicensis* and *Cynoscionstriatus* (Teleostei: Perciformes: Sciaenidae) in South Brazil. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 107B:515-517, 1994.

LEVY, J.A.; MAGGIONI, R.; CONCEIÇÃO, M.B. Close genetic similarity among populations of the white croaker (*Micropogoniasfurnieri*) in the south and south-eastern Brazilian coast. I. Allozyme studies. **Fisheries Research**, 39:87-94, 1998.

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

MARTINS, C.; WASKO, P.A.; OLIVEIRA, C. FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, 26:33-38, 2003.

MICALES, J.A.; BONDE, M.R. Isozymes: Methods and Applications. In: SINGH, R.P.; SINGH, U.M. (eds.). **Molecular methods in plant pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 115-130.

MILANI, J.E.; MELO, G.H.J.; SOUZA, A.P.; FERNANDES, A.L.; FRANÇA, B.A. Bacia do Paraná. **Boletim de Geociências da Petrobras**, 15:265-287, 2007.

MOREIRA, M.L.H.; VARGAS, L.; RIBEIRO, P.R.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. 200p.

MOYLE, P.B.; LEIDY, R.A. Loss of biodiversity in aquatic ecosystems: evidence from fish faunas. In: FIELDER, P.L.; JAIN, S.K. (eds.). **Conservation biology: the theory and practice of nature conservation, preservation and management**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 127-169.

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

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

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

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley e Sons, 2006. 601p.

NEVO, E. Genetic variation in natural populations patterns and theory. **Theoretical Population Biology**, 13:121-177, 1978.

OLIVEIRA, K.K.C. **Desenvolvimento e validação de microssatélites para estudos genéticos do piau-verdadeiro, *Leporinus elongatus* (VALENCIENNES, 1850), na bacia do São Francisco**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012. 55p. Tese (Doutorado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura).

PERES, M.D.; VASCONCELOS, M.S.; RENESTO, E. Genetic variability in *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 28:717-724, 2005.

PHILIPPSEN, J.S.; RENESTO, E.; GEALH, A.M.; ARTONI, R.F.; SHIBATTA, O.A.; ZAWADZKI, C. Genetic variability in four samples of *Neoplecostomus yapo* (Teleostei: Loricariidae) from the rio Paranapanema basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 7:25-30, 2009.

PIRES, C.L.S. **Estudo do polimorfismo enzimatico em esterases de *eucalyptus grandis hill ex mai***. Campinas: Universidade Estadual de Campinas 1983. 138p. Instituto de Biologia. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal).

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Vida, 2002. 328p.

RAMOS, J.V.B.; SODRÉ, L.M.K.; ORSI, M.L.; ALMEIDA, F.S. Genetic diversity of the species *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes) in the Canoas Complex - Paranapanema River. **Neotropical Ichthyology**, 10:821-828, 2012.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS-JR., C.J. **Check list of the freshwater fishes of south and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 742p.

RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H.; PAIVA, S. Allozyme differentiation and relationships within *Hypostomus Lacépède, 1803* (Osteichthyes: Loricariidae) from the upper Paraguay River basin, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, 35:869-876, 2007.

RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H.; REVALDAVES, E. Genetic evidence for two species of the genus *Pimelodus Lacépède, 1803* (Siluriformes, Pimelodidae) in the Iguaçu River (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, 23:809-813, 2000.

RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H.; REVALDAVES, E. Biochemical Taxonomy of *Crenicichla* (Pisces: Perciformes: Cichlidae) of the Iguaçu River, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 44:15-22, 2001.

RENNO, J.F.; BERREBI, P.; BOUJARD, T.; GUYOMARD, R. Intraspecific genetic differentiation of *Leporinusfriderici* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and Brazil: a genetic approach to the refuge theory. **Jornal of Fish Biology**, 36:85-95, 1990.

RENNO, J.F.; GUYOMARD, R.; BOUJARD, T.; BASTIDE, C. Evidence for genetic isolation among four morphological species of *Leporinus* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana. **Living Resour**, 2:127-134, 1989.

RESENDE, E.K. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin, excluding the Upper Paraná Basin. In: CAROLSFELD, J.B.; HARVEY, C.; ROSS, E.A.; BAER (eds.). **Migratory fishes of South America: biology, fisheries, and conservation status**. Victoria: World Fisheries Trust/IDRC/World Bank, 2003. p. 99-155.

RESENDE, E.K.; PEREIRA, R.A.C.; ALMEIDA, V.L.L. **Peixes herbívoros da planície inundável do rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil**. Corumbá: Embrapa-CPAP, 1998. 24p.

REUSING, A.F.; RENESTO, E.; ROXO, F.F.; ZAWADZKI, C.H. Allozyme differentiation of two populations of the genus *Neoplecostomus* Eigenmann & Eigenmann, 1888 (Teleostei, Loricariidae) from the upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 34:496-501, 2011.

REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic variability of *Prochiloduslineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics**, 20:381-388, 1997.

REZENDE, J.R.; RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H. Genetic variability in three species of *Gymnotus*Linnaeus, 1758 (Gymnotiformes: Gymnotidae) from Caracustream of the upper Paraná River basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 7:623-628, 2009.

RICHARDSON, B.J.; BAVERSTOCK, P.R.; ADAMS, M. **Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies**. Sydney: Academic Press, 1986. 409p.

RIDLEY, M. **Evolução**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 450p.

ROBERTS, T.R. Osteology and classification of the neotropical characoid fishes of the families Hemiodontidae (including Anostomidae) and Parodontidae. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, 146:411-472, 1974.

SEELIGER, U.; CORDAZZO, C.; BARBOSA, F.A.R. **Os sites e o programa brasileiro de pesquisas ecológicas de longa duração**. Belo Horizonte: UFMG. Programa PELD, 2002. 184p.

SETTELE, J.; HAMMEN, V.; HULME, P.; KARLSON, U.; KLOTZ, S.; KOTARAC, M.; KUNIN, W.; MARION, G.; O'CONNOR, M.; PETANIDOU, T.; PETERSON, K.; POTTS, S.; PRITCHARD, H.; PYSEK, P.; ROUNSEVELL, M.; SPANGENBERG, J.; STEFFAN-DEWENTER, I.; SKYES, M.; VIGHI, M.; ZOBEL, M.; KÜHN, I. Alarm: Assessing Large-scale environmental Risks for biodiversity with tested Methods. **Gaia - Ecological Perspectives for Science and Society**, 14:60-72, 2005.

SHAKLEE, J.B.; TAMARU, C.S.; WAPLES, R.S. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. **Pacific Science Association**, 36:141-156, 1982.

SHAW, C.R.; PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, 4:297-320, 1970.

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

SOLÉ-CAVA, A.M.; THORPE, J.P. High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. **Biological Journal of the Linnean Society**, 44:65-80, 1991.

SOLFERINI, V.N.; SELIVON, D. Polimorfismo de isozimas. In: MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2001. p. 137-142.

THORPE, J.P.; SOLÉ-CAVA, A.M. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoologica Scripta*, 23:3-18, 1994.

TORRES, R.A.; MATOSO, D.A.; ARTONI, R.F. Genética de peixes neotropicais II. Biologia molecular de peixes neotropicais. **Ciências Biológicas e da Saúde**, 10:27-37, 2004.

VAL, A.L.; SCHWANTES A.R.; SCHWANTES M.L.B.; DE LUCA, P.H. Amido hidrolisado de milho como suporte eletroforético. **Ciência e Cultura**, 33:737-741. 1981.

VARI, R.P. Phylogenetic relations hips of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae. **Smithsonian Contributions to Zoology**, 378:1-60, 1983.

VARI, R.P.; WILLIAMS, A.M. Headstanders of the neotropical anostomid genus Abramites (Pisces: Characiformes: Anostomidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, 100:89-103, 1987.

VILLA, J.U.; CARAMASCHI, P.E. Índices de integridade biótica usando peixes de água doce: uso nas regiões tropical e subtropical. **Oecologia Brasiliensis**, 12:42-462, 2008.

WALLACE, A.R. **The geography distribution of animals**. New York: Harper e Brothers, Publishers, Franklin Square I.1876. 503p.

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

WEBB, E.C. **Enzyme nomenclature**. Recommendations of the nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. California: Academic Press, 1992. 863p.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution*, 19:395-420, 1965.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 590p.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J.; YE, Z.H.; MAO, J.X. **POPGENE, the user – friendly shareware for population genetic analysis molecular biology and biotechnology centre**. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>> Acesso em: 5, fevereiro, 2014.

ZAWADZKI, C.H. **Sistemática e variação aloenzimática da família Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) dos reservatórios de Corumbá e Itaipu, na bacia do alto rio Paraná, Brasil**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2001. 78p. Tese (Doutorado Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais).

ZAWADZKI, C.H.; ALVES, A.L.; RENESTO, E.; OLIVEIRA, C. Biochemical evidence of a possible new species of *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper Rio Parana´ basin, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, 32:573–582, 2004.