

SUZANA DE PAIVA

**Variabilidade Genética em Populações de *Hypostomus*
(Siluriformes: Loricariidae) do Rio Ivaí,
Bacia do Alto Rio Paraná, Brasil**

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
DEZEMBRO - 2006**

SUZANA DE PAIVA

Variabilidade Genética em Populações de *Hypostomus*
(Siluriformes: Loricariidae) do Rio Ivaí,
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.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
DEZEMBRO – 2006

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

P149v Paiva, Suzana de
Variabilidade genética em populações de *Hypostomus*
(Siluriformes: Loricariidae) do rio Ivaí, bacia do alto
rio Paraná, Brasil / Suzana de Paiva. -- Maringá :
[s.n.], 2006.
46 f. : il. color., figs.

Orientador : Prof. Dr. Erasmo Renesto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, 2006.

1. Hypostomus. 2. Isoenzimas. 3. Variabilidade
genética. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa
de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 21.ed. 597.49

Dedico aos meus sobrinhos, Bruno e Fernandinho, presentes de Deus.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar esperança, coragem e força para ultrapassar todos os obstáculos desta caminhada.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de pesquisa.

Ao professor doutor Erasmo Renesto, pela orientação, compreensão, paciência, confiança e amizade.

Às professoras doutora Maria Claudia Colla Ruvulo Takasusuki e doutora Ana Silvia Lapenta, pelo auxílio com os géis de poliacrilamida.

Ao doutor Cláudio H. Zawadzki, pelos inúmeros favores, além de sugestões e críticas durante a graduação e mestrado que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos funcionários da biblioteca setorial do Nupelia, pela atenção e confiança.

A todos os amigos, professores e funcionários dos laboratórios de Eletroforese Vegetal e Animal - DBC, pela convivência e amizade, em especial à Dolores, Andreyra, Ivanda, Ludimilla, Fábio, Daniel, Judy, Gislaine, Juliana Franzoni, Ana Luisa e Sérgio.

Aos amigos, professores e funcionários da Citogenética de Peixes - DBC, por me agüentarem todos os dias invadindo o seu laboratório: Maria José, Edner, Gisele, Paulo, Thiago, Lana, Valéria, Renata, Alexandre, Carla, Kátia, Leonardo e professoras Isabel e Ana Luiza.

Aos amigos Fernanda e Leandro, pelo incentivo, e Ricardo, pela ajuda com os peixes.

À amiga Ana Paula pela amizade, compreensão, paciência e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Divino e Terezinha, e meus irmãos, Rosilene e Rosinaldo, pelo incentivo e ajuda incondicional para minha formação profissional.

A todos os demais amigos, familiares, professores e funcionários que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Suzana de Paiva, nasceu em 10 de outubro de 1977, em Apucarana, Paraná.

Concluiu o Ensino Fundamental no ano de 1991, na Escola Estadual Vital Brasil e o Ensino Médio em 1994, no Colégio Estadual Dr. Gastão Vidigal, ambos da cidade de Maringá.

Em março de 1999, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, realizando estágio pelo Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupelia) em eletroforese de isoenzimas e participando entre outras atividades, de projetos de pesquisa e iniciação científica. Ao final do ano letivo de 2003 obteve o título de licenciada em Ciências Biológicas pela referida instituição.

Em abril de 2004, iniciou o curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Ordem Siluriformes	3
2.2. Família Loricariidae	3
2.3. Subfamília Hypostominae Kner, 1853	5
2.4. Gênero <i>Hypostomus</i> Lacépède, 1803	5
2.5. <i>Hypostomus albopunctatus</i> (Regan, 1908).....	6
2.6. <i>Hypostomus hermanni</i> (Ihering, 1905).....	6
2.7. <i>Hypostomus regani</i> (Ihering, 1905).....	6
2.8. Eletroforese de isoenzimas	7
2.9. Estudos das isoenzimas em populações da ictiofauna brasileira.....	9
2.10. Estudos das isoenzimas em populações do gênero <i>Hypostomus</i>	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Rio Ivaí - caracterização da área	14
3.2. Coleta e armazenagem.....	15
3.3. Eletroforese em gel de amido	18
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	19
3.5. Análise das isoenzimas.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

PAIVA, Suzana de. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2006. **Variabilidade Genética em Populações de *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) do Rio Ivaí, Bacia do Alto Rio Paraná, Brasil.** Orientador: Dr. Erasmo Renesto. Professoras conselheiras: Dr^a. Ana Silvia Lapenta e Dr^a. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

O gênero *Hypostomus* apresenta uma taxonomia complexa devido a uma ampla variação na morfologia e no padrão de coloração o que dificulta a identificação de muitas espécies. Através da eletroforese de isoenzimas foram analisados *Hypostomus albopunctatus*, *H. hermanni*, *H. regani* e mais um morfótipo deste gênero (*Hypostomus* sp. 1) do rio Ivaí (PR). O estudo de nove sistemas enzimáticos (AAT, ACP, ADH, EST, GCPDH, G3PDH, LDH, MDH e SOD) revelou 14 locos, sendo alguns deles diagnósticos para *Hypostomus* sp. 1 (Adh-A e G3pdh-B), *H. hermanni* (sAat-B e Gcpdh-A) e *H. albopunctatus* (Est-2), evidenciando um isolamento reprodutivo entre as quatro populações. Com exceção de *H. albopunctatus* que exibiu um valor de heterozigosidade (H_e) igual à zero, as espécies analisadas apresentaram valores acima da média para peixes (0,051): 0,126 para *Hypostomus* sp. 1, 0,199 para *H. hermanni* e 0,085 para *H. regani*. Os valores de distância genética mostraram uma proximidade maior entre *H. albopunctatus* e *H. regani* ($D = 0,218$), enquanto *Hypostomus* sp. 1 e *H. hermanni* apresentaram a maior divergência genotípica ($D = 0,563$). Os resultados indicam que as populações analisadas apresentam uma ampla variação interespecífica da sua constituição genética.

Palavras-chave: *Hypostomus*, aloenzimas, variabilidade genética.

ABSTRACT

PAIVA, Suzana de. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, December, 2006. **Genetic Variability in *Hypostomus* Populations (Siluriformes: Loricariidae) from Ivaí River, Upper Paraná River Basin, Brazil.** Adviser: Dr. Erasmo Renesto. Co-Advisers: Dr. Ana Silvia Lapenta and Dr. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

The genus *Hypostomus* shows a complex taxonomy due to a wide variation in its morphology and color pattern what difficult the identification of many species. The isozyme electrophoresis technique was employed to analyse *Hypostomus albopunctatus*, *H. hermanni*, *H. regani* and one morphotype of this genus (*Hypostomus* sp. 1) from the Ivaí river (Paraná State). The study of nine enzyme systems (AAT, ACP, ADH, EST, GCPDH, G3PDH, LDH, MDH and SOD) allowed the score of 14 loci, some of them being diagnostic for *Hypostomus* sp. 1 (Adh-A and G3pdh-B), *H. hermanni* (sAat-B and Gcpdh-A), and *H. albopunctatus* (Est-2), revealing reproductive isolation between them. Except for *H. albopunctatus*, which showed zero heterozygosity value (H_e), the analyzed species showed values above the average for fishes (0.051): 0.126 in *Hypostomus* sp. 1, 0.199 in *H. hermanni*, and 0.085 in *H. regani*. The genetic distance values showed a greater proximity between *H. albopunctatus* and *H. regani* ($D = 0.218$), where as *Hypostomus* sp. 1 and *H. hermanni* were the most divergent ($D = 0.563$). Results pointed out that the analyzed populations show a wide interspecific variation of their gene pool.

Key-words: *Hypostomus*, allozymes, genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes são os vertebrados mais antigos e numerosos, representados por mais de 20.000 espécies (Lowe-McConnell, 1999). A ictiofauna da região Neotropical (América do Sul e Central) é a mais diversificada, composta por aproximadamente 6.000 das 13.000 espécies de peixes de água doce, sendo 4.475 descritas e provavelmente 1.550 ainda não descritas (Reis et al., 2003).

Das 455 famílias de peixes, a Loricariidae, da ordem Siluriformes, é a sexta maior família do mundo (Nelson, 1984) e a segunda maior do Neotrópico, constituída por aproximadamente 680 espécies já descritas e cerca de 300 espécies ainda não descritas (Reis et al., 2003). Na subfamília Hypostominae, existem muitas espécies com *status* ainda não bem definidos, devido principalmente a uma ampla variação intraespecífica na morfologia e padrão de cores. Isto ocorre principalmente no gênero *Hypostomus* (Weber, 2003).

Levantamentos da ictiofauna da bacia do rio Paraná indicam que, em seu trecho brasileiro, existem mais de 250 espécies de peixes, sendo 91 espécies de Siluriformes. Neste total, não estão incluídos mais de 16 espécies de *Hypostomus*, que não apresentam um consenso em relação a sua taxonomia, necessitando de mais estudos para uma identificação específica (Agostinho e Júlio Jr., 1999).

Durante o século XIX e início do século XX, a definição morfológica de espécie dominou a taxonomia animal (Mayr, 1977), em que basicamente as diferenças morfológicas eram usadas como critério para a determinação de uma espécie. Para Mayr (1963), em organismos que apresentam reprodução sexuada, espécies são “grupos de populações naturais real ou potencialmente intercruzantes que são reprodutivamente isolados de outros grupos semelhantes”. Além de constituírem uma “comunidade reprodutiva” e “unidade ecológica”, os membros de uma espécie representam uma “unidade genética”, formada por seu amplo patrimônio gênico em intercomunicação. Este isolamento reprodutivo é uma adaptação para proteger os genes já bem integrados e co-adaptados da espécie (Mayr, 1977).

Identificar espécies na natureza significa detectar mecanismos de isolamento reprodutivo entre populações semelhantes (Dobzhansky et al., 1977). Nos organismos que sobrevivem e se reproduzem em condições de laboratório, é possível verificar diretamente a existência destes mecanismos, principalmente naqueles que apresentam ciclo de vida curto. Todavia, para os que não se reproduzem em laboratório, isto se torna uma tarefa extremamente difícil. Para contornar esta dificuldade, além da análise de caracteres morfológicos é utilizada a análise de diferenças genéticas (Thorpe e Solé-Cava, 1994). Os marcadores bioquímicos ou moleculares como isoenzimas ou fragmentos de DNA, podem ser utilizados para caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de amostras de células e tecidos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Embora as diferenças morfológicas sejam reflexos de diferenças genéticas, algumas são muito suscetíveis às influências do ambiente. Além disso, muitas populações se diferenciam morfológicamente sem apresentarem isolamento reprodutivo (raças) e outras se formam sem grande diferenciação morfológica (espécies crípticas) (Dobzhansky et al., 1977).

No rio Ivaí, um afluente do alto rio Paraná, foram encontrados alguns espécimes do gênero *Hypostomus*, sendo estes separados inicialmente por diferenças morfológicas em um morfótipo (*Hypostomus* sp. 1) e três espécies (*Hypostomus albopunctatus*, *Hypostomus hermanni* e *Hypostomus regani*). O objetivo deste trabalho foi verificar através da técnica de eletroforese de isoenzimas se existe um isolamento reprodutivo entre estas quatro populações, bem como, estimar o nível de variabilidade genética em relação aos sistemas enzimáticos analisados. Esperando-se, desta forma, ampliar os conhecimentos em relação ao gênero *Hypostomus* e contribuir para os estudos de sistemática. E, até mesmo, contribuir em planos futuros de manejo para manutenção do estoque de peixes e na conservação genética destas espécies.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ordem Siluriformes

A ordem Siluriformes é formada por 31 famílias, com aproximadamente 400 gêneros, englobando cerca de 2.200 espécies, sendo 2.155 de água doce (Nelson, 1984). Juntamente com os Characiformes, compõem a maior parte da ictiofauna dos rios da América do Sul (Lowe-McConnell, 1999). O mesmo acontece na bacia do alto rio Paraná, onde mais de 85% da fauna de peixes pertence às duas ordens citadas, com leve predomínio de Characiformes (Agostinho et al., 1997).

As principais características dos peixes Siluriformes são: corpo sem escamas, revestido por placas ósseas ou pele nua e barbilhões ao redor da boca, rudimentares ou desenvolvidos (Nakatani et al., 2001).

2.2. Família Loricariidae

Os loricarídeos estão distribuídos de um extremo a outro da região Neotropical, desde o norte da Costa Rica até o sul da Argentina, sendo a maioria das espécies encontradas ao leste dos Andes (Reis et al., 2003). Esta família encontrava-se dividida em seis subfamílias: Ancistrinae com 217 espécies (Fisch-Muller, 2003); Loricariinae com 209 espécies (Ferraris, 2003), Hypostominae com 169 espécies (Weber, 2003), Hypoptopomatinae com 79 espécies (Schaefer, 2003), Neoplecostominae com sete espécies (Ferraris, 2003) e Lithogeneinae com uma espécie (Reis et al., 2003). No entanto, Armbruster (2004) considerou Ancistrinae novamente como uma tribo (Ancistrini), dentro da subfamília Hypostominae. Mais recentemente, Reis et al. (2006), propuseram uma nova subfamília: Delterinae.

Dentre as 39 famílias que englobam as 2.300 espécies válidas de peixes de água doce existentes no Brasil, a família Loricariidae é a segunda maior delas, representada por 372 espécies (Buckup, 2006). A amplitude dos loricarídeos se reflete também na variação do número de cromossomos, que vai de $2n = 36$ em

Rineloricaria latirostris (Giuliano-Caetano, 1998), a $2n = 96$ em *Upsilonodus* sp. (Kavalco, 2005).

Os loricarídeos, conhecidos popularmente como cascudos ou acarís, apresentam geralmente hábito bentônico (vivem sobre o fundo ou próximo a ele), tendo como característica básica o corpo coberto por placas ósseas dispostas em várias séries (Santos et al., 1984; Britski et al., 1999; Graça, 2004). Estas placas ósseas formam uma armadura que protege seu corpo contra possíveis abrasões, predadores e a dessecação (Lowe-McConnell, 1999). O primeiro raio da nadadeira dorsal é duro, mas não na forma de espinho pungente (Santos et al., 1984). A boca é inferior e em forma de ventosa (Santos et al., 1984; Britski et al., 1999; Graça, 2004) que adere ao substrato, com os dentes dispostos em uma única série em cada maxila, bifurcados ou em forma de colher (Santos et al., 1984). Ao redor da boca são encontrados barbilhões rudimentares (Nakatani et al., 2001). A maioria tem preferência por águas correntes (ambientes lóticos) de substrato rochoso onde raspam as pedras (Britski et al., 1999), alimentando-se de algas, detritos, sedimentos e invertebrados (Hahn et al., 1997).

Dispositivos sutoriais que permitem aos peixes aderirem a superfícies rochosas, juntamente com o achatamento dorsoventral do corpo e alongamento horizontal das nadadeiras pares caracterizam adaptações para a vida em águas torrentosas, como no caso de Siluriformes encouraçados (Lowe-McConnell, 1999).

A presença de estômago vazio nesta família (Py-Daniel, 1984; Fugi, 1993) indica que ele teria além da função de digestão, a de respiração, funcionando como um órgão respiratório acessório (Hahn et al., 2004). Segundo Lowe-McConnell (1999), em muitos peixes tropicais existem adaptações respiratórias especiais que proporcionam a utilização do ar atmosférico. Naqueles que utilizam a boca para aderir ao substrato, como os loricarídeos, estas modificações são necessárias para que eles possam respirar.

Seu intestino é enovelado e muito longo (Santos et al., 1984; Lowe-McConnell, 1999), podendo atingir aproximadamente 20 vezes (Py-Daniel, 1984) o comprimento do corpo.

2.3. Subfamília Hypostominae Kner, 1853

Os membros dessa subfamília encontram-se divididos em cinco tribos Ancistrini, Corymbophanini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Rhinelepini (Armbruster, 2004) e são, em geral, restritos a água doce. Durante o dia, ficam entre pedras e galhos de árvores caídos e iniciam suas atividades, geralmente, com o pôr-do-sol (Weber, 2003).

Estudos em nível molecular têm esclarecido a sistemática desta subfamília, sendo que mudanças na sua nomenclatura são esperadas, uma vez que estes estudos parecem indicar que um terço das espécies atuais ainda não foi descritas (Weber, 2003).

2.4. Gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803

Os *Hypostomus* (= *Plecostomus*) possuem o focinho revestido de placas pequenas e nadadeira adiposa (Britski et al., 1999). Weber (2003) sugere que este gênero seja constituído de aproximadamente 106 espécies já descritas, enquanto Armbruster (2004) propõe 146 espécies, sendo este o único gênero da tribo Hypostomini Kner, 1853.

Os organismos deste grupo se alimentam de algas, sedimentos e detritos (Hahn et al., 1997 e 2004). A boca (em forma de ventosa), os dentes (raspadores) e o comprimento do intestino (longo) caracterizam uma alta especialização deste gênero para a aquisição e processamento de detritos (Delariva e Agostinho, 2001).

O gênero possui espécies não migradoras com fecundação externa (Miyamoto, 1990). Apresenta cuidado parental (Suzuki et al., 2004; Lowe-McConnell, 1999) como guardar os ovos, já que desovam pequenas ninhadas, e fazem isso geralmente em buracos nas margens dos rios (Lowe-McConnell, 1999), os quais podem ser escavados pelos próprios peixes. Um exemplo é a espécie *H. ternetzi*, que apresenta um período curto de desova e os machos guardam seus ovos adesivos em cavidades (Suzuki et al., 2000). Os espécimes deste gênero têm os maiores ovos entre todos os teleósteos da bacia do Paraná (Suzuki, 1992, apud Suzuki et al., 2000).

Dimorfismo sexual de tamanho é comum neste gênero, sendo que os machos são geralmente maiores que as fêmeas (Suzuki et al., 2000). De acordo com Py-Daniel e Fernandes (2005), a variação no tamanho do corpo é possivelmente a categoria de dimorfismo sexual mais comum entre os peixes.

2.5. *Hypostomus albopunctatus* (Regan, 1908)

Esta espécie tem o corpo e as nadadeiras escuros com pintas claras e é conhecida popularmente no Brasil como cascudo ferro. Sua distribuição abrange a bacia do alto rio Paraná (Weber, 2003) e rio Iguaçu (Garavello et al., 1997). Penczak et al. (1998) em um estudo de amostragem qualitativa de peixes no rio Ivaí, encontraram 67 espécies de diferentes ordens, entre elas *H. albopunctatus*. Esta é a única espécie de *Hypostomus*, até o momento, que tem o espinho da nadadeira ventral com comprimento maior ou igual ao da nadadeira peitoral, além de dentes robustos com a parte superior curta (Zawadzki et al., 2005). A espécie apresenta o número cromossômico de $2n = 74$ (Artoni e Bertollo, 1996). Uma amostra de indivíduos do rio Paraná foi estudada através da eletroforese de isoenzimas (Zawadzki et al., 2005).

2.6. *Hypostomus hermanni* (Ihering, 1905)

Hypostomus hermanni tem o corpo claro com pintas escuras. Encontra-se distribuído pela América do Sul (Weber, 2003) e apresenta número diplóide $2n = 68$ (Lara-Kamei e Júlio Jr., 2002). Análise das isoenzimas desta espécie foi realizada em exemplares do ribeirão Keller, um afluente da margem direita do rio Ivaí, revelando 25 locos e um total de 35 alelos (Zawadzki et al., 2004b).

2.7. *Hypostomus regani* (Ihering, 1905)

No Brasil, esta espécie é conhecida popularmente como cascudo-chita, cascudo-chitão ou chitão. Está distribuída pela América do Sul nas bacias dos rios

Paraná, Paraguai e Uruguai (Weber, 2003). Em levantamentos realizados na bacia do alto rio Paraná, já foram encontrados exemplares no canal principal do rio Paraná, no rio Ivinheima, em canais laterais do reservatório de Itaipu, riachos e ribeirões (Agostinho et al., 2004), na bacia do rio Corumbá (GO) (Zawadzki, 2001), bem como, no rio Ivaí (Penczak et al., 1998). Martinez et al. (2006) em análises citogenéticas dos mesmos exemplares de *H. regani* deste trabalho, encontraram número cromossômico de $2n = 72$, valor este que corrobora com os dados da literatura (Artoni e Bertollo, 1996). Este peixe apresenta o corpo e as nadadeiras castanhos com pintas claras. Estudo com exemplares do alto rio Paraná revelou que esta espécie alimenta-se preferencialmente de detritos orgânicos (Delariva e Agostinho, 2001). Espécimes dos reservatórios de Corumbá (Zawadzki, 2001) e Itaipu (Zawadzki et al., 2005) tiveram 14 sistemas isoenzimáticos analisados pela técnica de eletroforese.

2.8. Eletroforese de isoenzimas

O princípio básico da eletroforese consiste na migração de moléculas ionizadas, sob a influência de um campo elétrico, de acordo com sua carga elétrica e peso molecular. A partir do desenvolvimento da eletroforese em gel de amido (Smithies, 1955) e a aplicação do método histoquímico para visualização das enzimas no gel (Hunter e Markert, 1957), a técnica de eletroforese de enzimas foi aperfeiçoada na metade da década de 60, o que permitiu os estudos de um amplo número de proteínas em um mesmo organismo (Avisé, 1975).

As isoenzimas ou isozimas são definidas por Markert e Moller (1959) como formas múltiplas de uma mesma enzima que ocorrem em um mesmo organismo com afinidade sobre um mesmo substrato. Estas moléculas podem apresentar diferenças nas seqüências polipeptídicas, cargas elétricas, pesos moleculares, além de outras variáveis (Thorpe e Solé-Cava, 1994; Machado et al., 1999). São controladas geneticamente por alelos ou por genes situados em diferentes locos, no entanto, algumas isoenzimas são controladas por alelos de um só loco e são denominadas de aloenzimas. Elas podem ser produtos de processamentos

diferencias de uma mesma molécula de mRNA, ou de modificações do próprio polipeptídeo após a sua transcrição (Machado et al., 1999).

Diferenças em nível de seqüências de DNA que codificam as isoenzimas podem ser detectadas por diferenças da mobilidade destas enzimas em um campo elétrico (Ferreira e Grattapaglia, 1998), ou seja, a substituição de um aminoácido em uma molécula de proteína pode alterar sua carga elétrica ou causar mudanças na sua conformação, alterando a sua taxa de migração. Esta molécula de enzima com diferença de mobilidade caracteriza-se como um novo alelo (Thorpe e Solé-Cava, 1994). Freqüentemente, a única diferença entre as isoenzimas é a substituição de um ou vários aminoácidos (Micales e Bonde, 1995).

Assim como as frações polipeptídicas e de proteínas totais, as isoenzimas representam os produtos primários dos genes, que passaram pelos processos de transcrição e tradução. Geneticamente, esta caracterização é mais refinada do que as caracterizações morfológicas, que geralmente são produtos de mais de um gene associado a mecanismos diferenciais de expressão e de regulação e a fatores ambientais (Machado et al., 1999). Outra vantagem é que a expressão das isoenzimas é normalmente codominante. Isto significa que os heterozigotos têm fenótipos diferentes dos homozigotos (Thorpe e Solé-Cava, 1994), ou seja, em um indivíduo diplóide, ambos os alelos de um loco são expressos e visualizados (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Este fato permite que parâmetros como freqüências genotípicas e freqüências alélicas possam ser estimados e a partir deles se obter coeficientes de diversidade genética e heterozigosidade, afim de que populações possam ser comparadas (Thorpe e Solé-Cava, 1994; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os locos analisados podem ser considerados como uma amostra aleatória do genoma, sendo assim, representativa da população. Os parâmetros obtidos são considerados como indicadores populacionais (Solferini e Selivon, 2001).

A eletroforese de isozimas vem sendo utilizada nas últimas décadas para estimar os níveis de variabilidade genética e o fluxo gênico em populações naturais, no estudo da dispersão de espécies, análise de filogenias e hibridização natural, bem como, no melhoramento de plantas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Além disso, Murphy et al. (1996) citam outras aplicações: avaliação de paternidade e limites de

espécies (aplicações intraespecíficas), estudo de processos de especiação, paleobiogeografia, taxas de evolução e origem de plantas poliplóides (aplicações interespecíficas).

Em estudos de sistemática, a eletroforese de isoenzimas apresenta entre outras vantagens, a possibilidade de se obter dados adequados da descrição de uma espécie, a partir de um número pequeno de indivíduos amostrados (Avice, 1975; Thorpe e Solé-Cava, 1994), além de organizar espécies próximas de acordo com a porcentagem de alelos ou genótipos compartilhados (Avice, 1975). Segundo Thorpe e Solé-Cava (1994), se duas formas simpátricas forem da mesma espécie, devem ter as mesmas frequências gênicas em cada loco gênico. É possível dizer que, no mínimo, os dados de isoenzimas contribuem para a identificação bioquímica dos organismos (Buth e Murphy, 1999).

2.9. Estudos das isoenzimas em populações da ictiofauna brasileira

A técnica de eletroforese de isoenzimas tem sido utilizada no estudo de diversos tipos de organismos, entre eles os peixes. Ela permite analisar os dados da expressão do DNA em diferentes ordens, a fim de atingir diferentes objetivos.

A descoberta de novas espécies de peixes tem aumentado no Brasil, sendo que na última década, este crescimento foi superior a 15% (341 spp.), devido principalmente ao conhecimento da fauna de pequenos peixes de cabeceira e ambientes especializados. Entre as novas espécies encontradas destacam-se aquelas pertencentes às famílias Characidae (77 spp.), Loricariidae (73 spp.) e Rivulidae (51 spp.) (Buckup et al., 2006).

A análise das aloenzimas tem auxiliado na discriminação de novas espécies de peixes de cabeceira, contribuindo para o aumento destes números. Como por exemplo, o estudo realizado por Zawadzki et al. (2004a) com *Neoplecostomus* sp. do córrego Taquari, afluente do rio Corumbá (GO); e *Neoplecostomus paranensis* do ribeirão Hortelã, tributário do rio Paranapanema (SP), pertencentes a bacia do alto rio Paraná. As espécies deste gênero apresentam uma similaridade morfológica e cariotípica que dificulta sua identificação, assim, outras características seriam

necessárias para identificar novas espécies deste grupo. A análise de 14 sistemas enzimáticos permitiu detectar 22 locos. Seis deles foram diagnósticos: Acp-A, Adh-A, Est-A, Gpi-A, Ldh-A e Ldh-B. A identidade genética de Nei (1978) foi de 0,731. Estes valores, juntamente com a presença de uma nadadeira adiposa incomum para este gênero, mostraram que os exemplares do córrego Taquari são distintos de *N. paranensis* e possivelmente representam uma nova espécie.

Entretanto, ao contrário deste caso, Renesto et al. (2001) analisaram exemplares de *Crenicichla iguassuensis* e de um morfótipo (*Crenicichla* sp.) que diferia da espécie citada pela morfologia dos lábios, ambos do rio Iguazu (PR). O estudo de dezesseis sistemas enzimáticos revelou 27 locos, sendo 25,9% e 14% polimórficos para *C. iguassuensis* e *Crenicichla* sp., respectivamente. A identidade genética (I) de Nei (1978) foi de 0,993 e nenhum loco diagnóstico foi encontrado para distinguir as duas populações. Assim, estes dados não corroboraram com a hipótese de que *Crenicichla* sp. seria uma espécie distinta de *C. iguassuensis*, mas sugerem que as duas formas representam um polimorfismo da espécie *C. iguassuensis*. Segundo Thorpe (1982), a identidade genética de Nei (1972) entre populações da mesma espécie excede o valor de 0,85.

Através das frequências gênicas obtidas pela análise de isoenzimas é possível também quantificar a variabilidade genética de uma população. Peres et al. (2005b) estudaram a variabilidade genética de duas populações de *Astyanax altiparanae*, que é uma das espécies mais abundantes da bacia do alto rio Paraná e representam uma importante fonte de alimento para muitas espécies de peixes piscívoros que são comercializados. Um total de 13 enzimas foi analisado em amostras do fígado, coração, estômago, brânquia e músculo. A proporção de locos polimórficos foi de 52,38% para a população do alto rio Paraná (PR) e 38,10% para a população do ribeirão Ficha (PR). O cálculo da variabilidade genética indicou um valor de heterozigosidade 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.

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), peixe este de interesse econômico. 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, sendo que 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%) quando comparado com a literatura. 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.

Almeida e Sodré (1998) também estudaram as isoenzimas da família Pimelodidae (*Pimelodus maculatus*, *Iheringichthys labrosus* e *Pinirampus pirinampu*) do rio Tibagi (PR). Os dados ($I = 0,58$) indicaram que *Iheringichthys labrosus* e *Pinirampus pirinampu* pertenceriam a espécies congênicas, ao contrário das características morfológicas que agrupam as duas espécies em gêneros distintos.

Caso semelhante ocorreu com o gênero *Schizodon* (*S. intermedius* e *S. nasutus*) e *Leporinus* (*L. friderici*, *L. elongatus* e *L. obtusidens*) deste mesmo rio, agrupadas desta forma com base em caracteres morfológicos. No entanto, o valor da identidade genética entre *L. friderici* e *S. intermedius* (0,749) e *L. friderici* e *S. nasutus* (0,787), obtidos pela análise de seis sistemas enzimáticos (EST, PGM, G-3-PDH, IDHP, LDH e MDH) e proteínas não específicas (PT), indicou que estas espécies também seriam congênicas (Chiari e Sodré, 1999).

Na Amazônia Central, Teixeira et al. (2006) complementaram os estudos citogenéticos de piranhas (*Serrasalmus rhombeus*) da Lagoa Catalão, que apresentaram dois citótipos ($2n = 58$ e $2n = 60$), com a análise da enzima esterase-D. Os valores das frequências alélicas, em um dos três locos encontrados, permitiram distinguir mais um citótipo ($2n = 60 B$) entre os exemplares analisados.

No sul da costa brasileira, duas populações de Perciformes (*Cynoscion jamaicensis* e *Cynoscion striatus*) foram analisadas através 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, sugeriam 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 com esta hipótese.

2.10. Estudos das isoenzimas em populações do gênero *Hypostomus*

Estudos de isoenzimas em espécies de *Hypostomus* foram realizados principalmente, em exemplares que vivem em rios e riachos da bacia do rio Paraná, contribuindo para a avaliação da variabilidade genética das populações, identificação de novas espécies, distinção entre as espécies já descritas, bem como, na inferência de relações filogenéticas das espécies que vivem nesta região. Estes dados são de grande importância, visto que, a sistemática deste gênero para a bacia do rio Paraná representa um assunto muito complexo (Zawadzki et al., 2005), devido, entre outros aspectos, a uma ampla variação de caracteres como o número de placas dérmicas, dentes e padrão de coloração (Gosline, 1947 apud Zawadzki, 2001).

No ribeirão Maringá, tributário do rio Pirapó, *H. strigaticeps* e duas espécies ainda não descritas (*Hypostomus* sp. 1 e *Hypostomus* sp. 2) foram diferenciadas por alelos distintos de três locos enzimáticos: Acp-A, Gcdh-A e sMdhp-A (Paiva et al., 2005). Na bacia do rio Corumbá, diferenças nas frequências alélicas entre 10 morfótipos de *Hypostomus* foram encontradas (Zawadzki, 2001). Enquanto, Paiva et al. (2001) separaram por diferenças alozímicas, quatro morfótipos de *Hypostomus* (*Hypostomus* sp. 1, *Hypostomus* sp. 2, *Hypostomus* sp. 3

e *Hypostomus* sp. 4) das espécies *H. boulengeri*, *H. latifrons* e *H. regani* coletados no rio Manso (MT), afluente do rio Paraguai.

Uma análise comparativa entre duas populações alopátricas de *H. margaritifera*, uma do reservatório de Itaipu e a outra do reservatório de Corumbá, foi realizada através de 25 locos enzimáticos. O valor da identidade genética (0,988) obtido a partir das frequências gênicas e a ausência de diferenças morfométricas expressivas entre as populações, indicaram que elas eram realmente da mesma espécie (Zawadzki et al., 2002).

A análise da variabilidade genética de doze espécies de *Hypostomus* do reservatório de Itaipu (Zawadzki et al., 2005), dez da bacia do rio Corumbá (Zawadzki, 2001), quatro do ribeirão Keller (Zawadzki et al., 2004b), três da bacia do rio Iguaçu (Zawadzki et al., 1999) e três do ribeirão Maringá (Paiva et al., 2005), revelaram diferentes valores de heterozigosidade média (H_e), os quais variaram de 0,000 em *Hypostomus* sp. 2, do ribeirão Maringá a 0,146 em *Hypostomus* sp. 1, do ribeirão Keller.

Outros estudos que refletem a importância e a aplicabilidade da eletroforese de isoenzimas para a ampliação dos conhecimentos em relação a este gênero, é a análise do padrão de expressão de 14 sistemas enzimáticos nos tecidos de coração, fígado e músculo esquelético branco de *H. aff. commersoni*, *H. derbyi* e *H. myersi* da bacia do rio Iguaçu (Zawadzki et al., 2001). Além de um estudo sobre inferência filogenética entre 15 espécies da subfamília Hypostominae, do rio Paraná, sendo 12 destas espécies pertencentes ao gênero *Hypostomus* (Zawadzki et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Rio Ivaí - caracterização da área

Os espécimes de *Hypostomus* utilizados neste estudo foram coletados no rio Ivaí (Figura 1), próximo à ponte sobre este rio ($23^{\circ}40'S$, $52^{\circ}07'W$), na rodovia PR 137, entre as cidades de Maringá e Campo Mourão (Paraná - Brasil).

O rio Ivaí possui uma bacia hidrográfica com 35.845 km^2 , localizada inteiramente no Estado do Paraná. Recebe este nome após a confluência do rio dos Patos com o rio São João e percorre um total de 685 km até sua foz (Maack, 1981). O rio Ivaí é um afluente da margem esquerda do alto rio Paraná e este, por sua vez, vai da confluência dos rios Paranaíba e Grande até as antigas Sete Quedas, fazendo parte

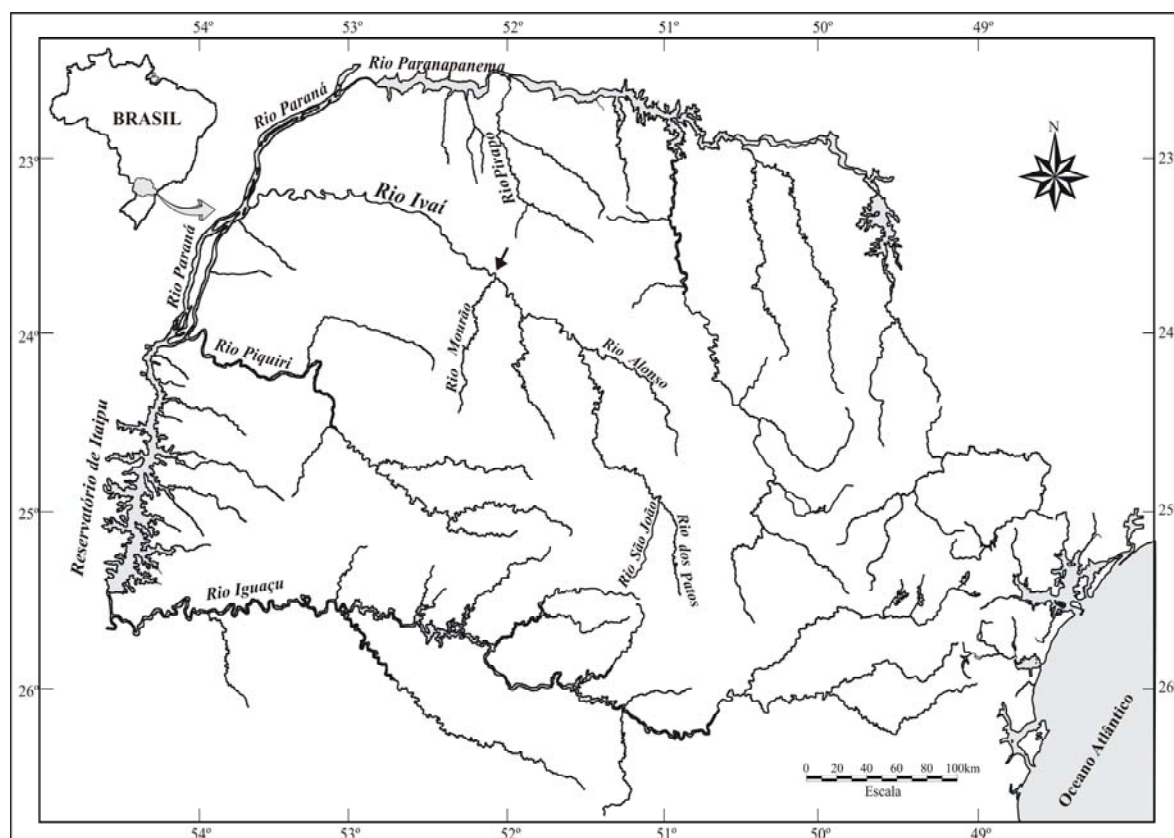


Figura 1 - Mapa hidrográfico do Estado do Paraná. O ponto de coleta no rio Ivaí está indicado pela seta.

da segunda maior bacia hidrográfica da América do Sul, a bacia do Prata (Paiva, 1982).

O aproveitamento hidrelétrico dos recursos hídricos desta bacia restringe-se a pequenas instalações, não havendo formação de reservatórios de acumulação (SUDERHSA, 1997). Entretanto, é prevista a construção de vários reservatórios ao longo do canal principal do rio, para produção de energia (SUDERHSA, 1998; ANA e MMA, 2006; MT, 2006; SUREHMA e GTZ, 1992 apud Penckzak et al., 1998). As centrais hidrelétricas a serem construídas seriam: Três Figueiras (Km 149,2), Ivatuba (Km 248,5), Bela Vista do Ivaí (Km 302,2), São João do Ivaí (Km 335,7), Ubaúna (Km 360,8) e Salto Ariranha (Km 447,1), além de um reservatório na foz do rio Alonso (Foz do Alonso - Km 399,6) (SUDERHSA, 1998; MT, 2006). Conforme SUDERHSA (1998), a construção estaria prevista após 2004, enquanto SUREHMA e GTZ (1992 apud Penckzak et al., 1998) relatam ser próximo de 2015.

Está previsto também a utilização deste rio para a navegação no trecho que vai da sua foz até a cidade de Doutor Camargo, em um estirão de aproximadamente 250 Km (ANA e MMA, 2006; MT, 2006).

3.2. Coleta e armazenagem

As coletas foram realizadas no período de maio de 2003 a maio de 2004 e resultaram na captura de 62 exemplares, sendo vinte e um de *Hypostomus* sp. 1 (Figura 2), treze de *H. albopunctatus* (Figura 3), dezenove de *H. hermanni* (Figura 4) e nove de *H. regani* (Figura 5). Amostras de músculo e fígado foram retiradas e conservadas a baixa temperatura (-20°C) até a extração das enzimas. Os espécimes testemunho foram depositados na coleção do Nupelia (Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura), da Universidade Estadual de Maringá.



Figura 2 - *Hypostomus* sp. 1 (Comprimento padrão 135,46 mm).



Figura 3 - *Hypostomus albopunctatus* (Comprimento padrão 181,00 mm).



Figura 4 - *Hypostomus hermanni* (Comprimento padrão 192,63 mm).



Figura 5 - *Hypostomus regani* (Comprimento padrão 184,88 mm).

3.3. Eletroforese em gel de amido

Os géis de amido foram preparados com amido de milho a uma concentração de 15%, sobre placas de vidro horizontais, utilizando três sistemas tampão distintos: Tris-Borato-EDTA (TBE), pH 8,6 (Boyer et al., 1963), Tris-Citrato (TC), pH 7,0 (Shaw e Prasad, 1970) e Tris-EDTA-Maleato (TEM), pH 7,4 (Murphy et al., 1996). Cada um específico para os diferentes sistemas enzimáticos e tecidos trabalhados (Quadro 1). Após atingirem a temperatura ambiente, os géis permaneceram sob refrigeração por aproximadamente 24 horas.

As amostras dos tecidos foram homogeneizadas com bastão de plástico em tubos de propileno (1,5 ml) com 2 gotas de tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5. Devido a presença de grande quantidade de gordura no fígado, foi adicionado tetracloreto de carbono (CCl₄) (Pausteur et al., 1988) na proporção de 1:2 (tecido:CCl₄), para ocorrer a sua precipitação. Os tubos foram centrifugados a 25.000 rpm (44720 x g), com temperatura entre 1°C a 5°C, durante 30 minutos.

Quadro 1 - Nome, número de Comissão de Enzima (n° E.C.), tecido, tampão e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido e poliacrilamida*; (F = fígado; M = músculo; 1 = Tris-borato-EDTA; 2 = Tris-citrato; 3 = Tris-EDTA-maleato; 4 = Tris-HCl; 5 = Tris-Glicina)

Enzima (abreviação)	n° E.C.	Tecido	Tampões	E. Q.
Álcool desidrogenase (ADH)	1.1.1.1	F	1	Dimérica
Aspartato aminotransferase (AAT)	2.6.1.1	F	3	Dimérica
Esterase (EST)*	3.1.1.1	F	4 e 5	Monomérica
Fosfatase ácida (ACP)	3.1.3.2	F	2	Monomérica
Glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH)	1.1.1.8	F	2	Dimérica
Glicose-1-desidrogenase - NAD ⁺ (GCDH)	1.1.1.118	F	3	Dimérica
L-Lactato desidrogenase (LDH)	1.1.1.27	M	2	Tetramérica
Malato desidrogenase (MDH)	1.1.1.37	F	2	Dimérica
Superóxido dismutase (SOD)	1.15.1.1	F	1	Dimérica

O extrato protéico (sobrenadante) foi aplicado no gel com pequenas tiras de papel-filtro (4 mm x 8 mm) Whatman 3MM[®] embebidas com as amostras. Em seguida, foi submetido à eletroforese horizontal contínua, sob refrigeração, durante seis horas para os sistemas tampão TC, pH 7,0 e TBE, pH 8,6, e sete horas para o tampão TEM, pH 7,4. A corrente elétrica nos géis, medido através de suas extremidades com um multímetro, foi de aproximadamente 100V. 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, preparadas segundo protocolo de (Murphy et al., 1996).

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 ou de separação com concentração de 11% de Acrilamida-Bisacrilamida e o gel de empilhamento ou concentrador a 3% (Quadro 2).

As amostras de fígado foram preparadas conforme já descrito no protocolo para o gel de amido, porém o tampão utilizado para macerar foi o Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 com 10% de glicerol, e centrifugadas por 20 minutos. Uma pequena alíquota

Quadro 2 - Componentes do gel de poliacrilamida

Componentes	Gel de separação	Gel de empilhamento
Solução Acrilamida-Bisacrilamida	5,68 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	6,22 ml	30 µl
Persulfato de Amônia	320 µl	250 µl
TEMED (Tetrametilenodiamina)	16 µl	3 µl

do sobrenadante (10 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 nove sistemas enzimáticos analisados em gel de amido e poliacrilamida estão descritos no Quadro 1. A nomenclatura das enzimas utilizadas foi a proposta pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology (1992). A interpretação genética dos zimogramas foi baseada na estrutura quaternária das enzimas segundo Ward et al. (1992). Os dados foram analisados no programa Popgene 3.1 (Yeh, 1999). 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

O estudo das quatro populações de *Hypostomus* do rio Ivaí, através de nove sistemas enzimáticos (Quadro 1) permitiu a análise de 14 locos (Quadro 3), os quais apresentaram um total de 40 alelos. Os padrões de expressão dos fenótipos foram similares àqueles obtidos para *Hypostomus* por Zawadzki et al. (2001). As Figuras 6 e 7 mostram a representação dos alelos mais freqüentes de cada enzima revelada em gel de amido e poliacrilamida, respectivamente, para as populações analisadas.

Alguns locos diagnósticos, os quais apresentam alelos exclusivos com uma alta freqüência para uma determinada espécie, foram detectados entre as populações: Adh-A e G3pdh-B para *Hypostomus* sp. 1, sAat-B e Gcdh-A para *H. hermanni* e Est-2 para *H. albopunctatus*. Um alelo do loco sAat-A que expressou uma banda com migração catódica mais lenta para *H. albopunctatus*, também separou esta espécie de *H. regani*.

O estudo de locos enzimáticos tem sido utilizado para descobrir ou confirmar a existência de espécies duvidosas ou espécies crípticas entre morfótipos simpátricos de vários organismos (Thorpe e Solé-Cava, 1994). No ribeirão Keller, foram coletados exemplares de *H. hermanni* e três morfótipos de *Hypostomus*. Entre os morfótipos, a análise de 14 sistemas enzimáticos permitiu identificar três locos diagnósticos para *Hypostomus* sp. 1 (Gdh-A, G6pdh-A e G6pdh-B), oito para *Hypostomus* sp. 2 (sAat-B, G3pdh-A, G3pdh-B, Gpi-B, Ldh-A, Ldh-B, sMdh-B e sMdhp-A) e um para *Hypostomus* sp. 3 (sMdh-A), distinguindo-os assim, em três espécies (Zawadzki et al., 2004b).

Variações nas freqüências alélicas entre os *Hypostomus* aqui analisados também evidenciaram uma possível diferenciação entre as populações. Em Est-2, além do alelo *d*, que foi diagnóstico para *H. albopunctatus*, o alelo mais freqüente de *Hypostomus* sp. 1 (*c*) e de *H. hermanni* (*e*), os quais foram exclusivos para cada uma destas populações, permitiram diferenciar a maioria de seus exemplares da espécie *H. regani* (alelo *f*). O mesmo caso também foi verificado para o loco

Quadro 3 - Frequências alélicas das quatro populações de *Hypostomus* do rio Ivaí

Locos	Alelos	<i>Hypostomus</i> sp. 1	<i>Hypostomus</i> <i>albopunctatus</i>	<i>Hypostomus</i> <i>hermanni</i>	<i>Hypostomus</i> <i>regani</i>
sAat-A	<i>a</i>	0,285	1,000	0,026	—
	<i>b</i>	0,714	—	0,736	1,000
	<i>c</i>	—	—	0,210	—
	<i>d</i>	—	—	0,026	—
sAat-B	<i>a</i>	0,023	—	—	—
	<i>b</i>	0,976	1,000	—	1,000
	<i>c</i>	—	—	1,000	—
Acp-A	<i>a</i>	0,047	—	—	—
	<i>b</i>	0,952	1,000	1,000	1,000
Adh-A	<i>a</i>	—	—	0,789	0,444
	<i>b</i>	0,071	—	—	—
	<i>c</i>	0,928	—	—	—
	<i>d</i>	—	1,000	0,210	0,555
Est-1	<i>a</i>	0,071	—	0,368	—
	<i>b</i>	0,023	—	—	—
	<i>c</i>	0,904	1,000	0,631	1,000
Est-2	<i>a</i>	0,119	—	0,052	—
	<i>b</i>	0,071	—	0,105	—
	<i>c</i>	0,809	—	—	—
	<i>d</i>	—	1,000	—	—
	<i>e</i>	—	—	0,631	—
	<i>f</i>	—	—	0,052	1,000
	<i>g</i>	—	—	0,157	—
Gcdh-A	<i>a</i>	1,000	1,000	—	1,000
	<i>b</i>	—	—	1,000	—
G3pdh-A	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000	1,000
G3pdh-B	<i>a</i>	—	—	0,947	0,666
	<i>b</i>	1,000	—	—	—
	<i>c</i>	—	1,000	0,052	0,333
Ldh-A	<i>a</i>	—	—	0,026	0,111
	<i>b</i>	1,000	1,000	0,973	0,888
sMdh-A	<i>a</i>	0,928	1,000	1,000	1,000
	<i>b</i>	0,071	—	—	—
mMdh-A	<i>a</i>	—	—	0,368	—
	<i>b</i>	1,000	1,000	0,631	1,000
sMdh-B	<i>a</i>	0,023	—	—	—
	<i>b</i>	0,261	1,000	1,000	1,000
	<i>c</i>	0,714	—	—	—
Sod-A	<i>a</i>	—	—	0,210	—
	<i>b</i>	1,000	1,000	0,789	1,000

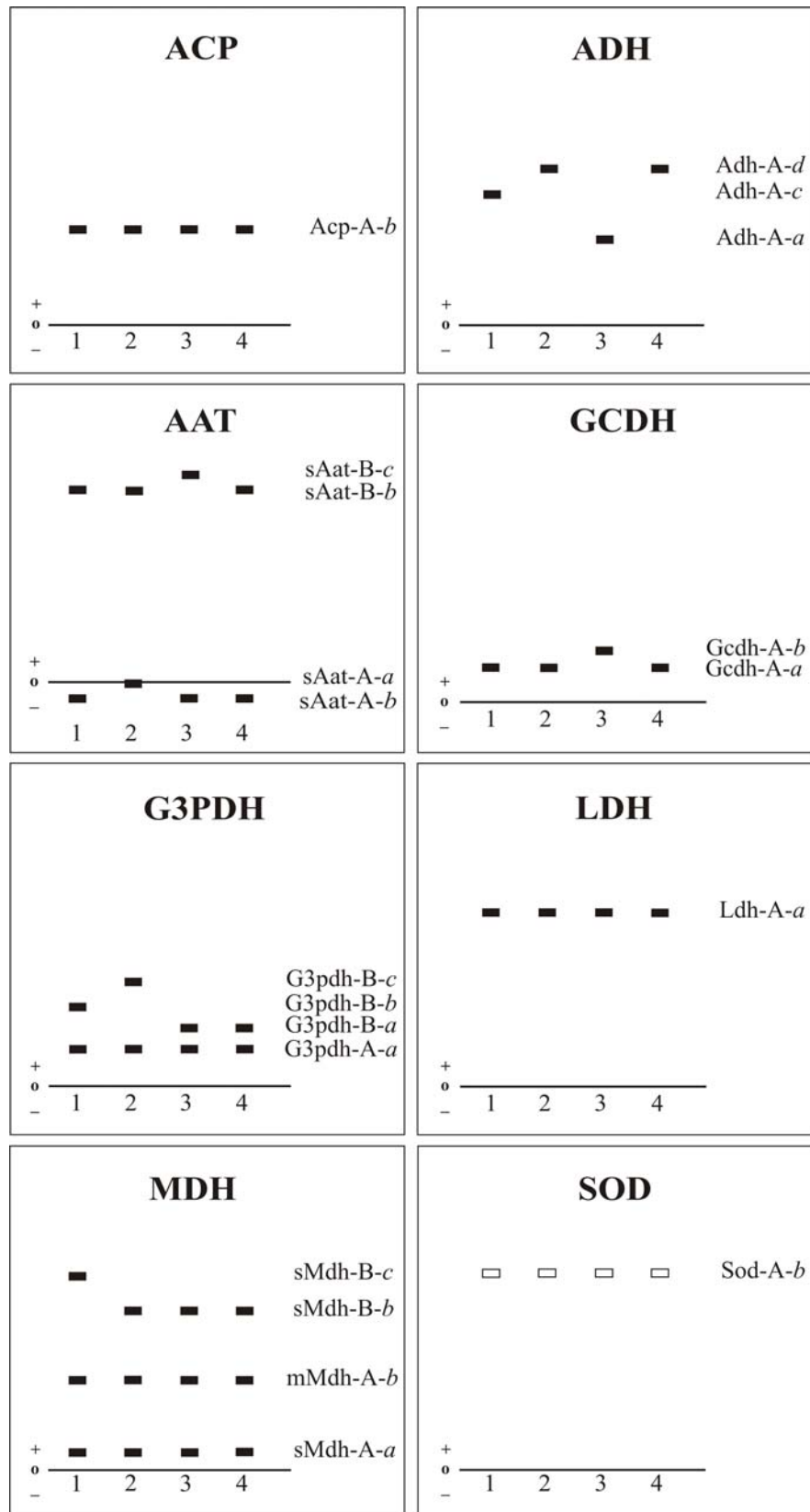


Figura 6 - Zimogramas dos sistemas enzimáticos analisados em gel de amido, com seus respectivos alelos mais freqüentes. 1 = *Hypostomus* sp. 1; 2 = *H. albopunctatus*; 3 = *H. hermanni*; 4 = *H. regani*.

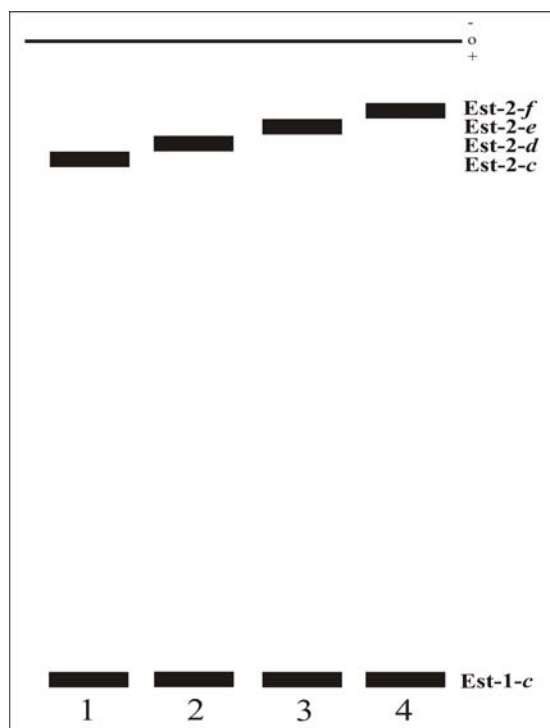


Figura 7 - Representação dos locos analisados da enzima esterase em gel de poliacrilamida, com seus respectivos alelos mais freqüentes. 1 = *Hypostomus* sp. 1; 2 = *H. albopunctatus*; 3 = *H. hermanni*; 4 = *H. regani*.

sMdh- B (alelo *c*) de *Hypostomus* sp. 1. E com uma freqüência um pouco menor para os alelos: *c* de sAat-A, *g* de Est-2, *a* de mMdh-A e *a* de Sod-A dos exemplares de *H. hermanni*. Levy e Cassano (1994) sugeriram que entre *Cynoscion jamaicensis* e *C. striatus*, um alelo em comum para o loco MDH-2* (*100) e outro alelo com freqüência de 0.20, encontrado somente em *C. jamaicensis* (*75), indicariam um processo de diferenciação que poderia tornar este loco em loco diagnóstico.

Na população de *Hypostomus* sp. 1, alguns alelos exclusivos foram detectados em baixa freqüência (Quadro 3) (sAat-B-*a*, Acp-A-*a*, Adh-A-*b*, Est-1-*b*, sMdh-A-*b*, sMdh-B-*a*), a maioria em indivíduos heterozigotos. A baixa freqüência de alguns alelos exclusivos, somada ao fato de parte destes locos não estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) nesta espécie, poderia caracterizar uma população que se encontra em processo de evolução, pois os alelos ainda não estariam fixos na população. Segundo Mayr (1977), novos genes são incorporados em populações na condição heterozigota, sendo que os homozigotos só passam a ser freqüentes muito depois dos heterozigotos. Três locos com este tipo de alelo foram

encontrados para cada uma das seguintes espécies: *Hypostomus strigaticeps* do ribeirão Maringá nos locos sAat-B-c (0,029), sIcdh-A-a (0,058) e Pgm-A-c (0,029) (Paiva et al., 2005), *H. derbyi* do rio Iguaçu nos locos GDH-1*-A (0,036), GPI-2*-C (0,071) e IDHP-1*-C (0,036) (Zawadzki et al., 1999) e *Hypostomus* sp. 3 do ribeirão Keller nos locos Gpi-B-a (0,031), mMdh-A-b (0,063) e sMdh-B-a (0,031) (Zawadzki et al., 2004b).

Segundo Thorpe e Solé-Cava (1994), em populações simpátricas, variação significativa em qualquer loco, representa uma barreira ao fluxo gênico e, no mínimo, isolamento reprodutivo parcial. Em organismos que têm reprodução sexual por fecundação cruzada, esta variação indica que duas populações deveriam ser consideradas como espécies diferentes.

Todos os locos, no presente estudo, apresentaram mais de um alelo em pelo menos uma das populações, com exceção do loco G3pdh-A, que apresentou o mesmo alelo fixado em todas as amostras.

Em esterase, além dos dois locos analisados foram encontrados mais seis locos, porém, não foi possível realizar uma interpretação adequada destas bandas, pois algumas tiveram uma fraca resolução ou sobreposição de locos. Esta fraca resolução pode ser devido a uma queda na atividade desta enzima, assim como proposto por Revaldaves et al. (1997) em exemplares de *Prochilodus lineatus*. Número semelhante, ou próximo de locos em esterase do presente trabalho, foi encontrado em outras espécies do gênero *Hypostomus*, nesta mesma bacia. No reservatório de Itaipu, *H. ternetzi* apresentou seis locos de esterase, enquanto *H. margaritifera*, *H. regani* e *H. microstomus* tiveram oito locos (Paiva et al., 2003). Em *H. albopunctatus* do rio Paraná e *H. aff. albopunctatus* do rio Iguaçu, seis locos desta enzima foram estudados (Lapenta et al., 1999).

Em *H. albopunctatus*, nenhum dos locos analisados foi polimórfico (Quadro 4). Um provável processo de endogamia, devido aos seus hábitos sedentários, poderia explicar a ausência de heterozigotos para os locos dessa espécie e, conseqüentemente, uma variabilidade genética com valor zero ($H_e = 0,000$). Zawadzki et al. (1999) encontraram o valor de 0,011 para *H. derbyi* e 0,017 para *H. myersi* do rio Iguaçu e sugeriram que processos endogâmicos poderiam estar

contribuindo para manutenção dos baixos níveis de heteroziguidade nestas espécies. Em *Hypostomus* sp. 2 do ribeirão Maringá (Paiva et al., 2005) e *Neoplecostomus paranensis* do ribeirão Hortelã (Zawadzki et al., 2004a) pertencente a família Loricariidae, também ocorreram somente locos em homozigose, ou seja, H_e igual a zero. Segundo os autores, a endogamia estaria atuando nestas espécies, devido a um provável isolamento por algumas barreiras geográficas nestes pequenos tributários.

Todavia, uma comparação entre os valores da heteroziguidade média de 84 espécies de peixes tropicais, em relação a estratégias reprodutivas, mostrou que o grupo das espécies não migradoras, com cuidado parental, como é o caso dos *Hypostomus*, ou com fecundação interna, tinham a menor média de heteroziguidade (0,046). Em seguida, ficou a média para as espécies migradoras de longa distância e sem cuidado parental (0,064) e o grupo não migrador e sem cuidado parental apresentou a maior média de H_e (0,081), indicando que o cuidado parental e a fecundação interna estariam associados com baixos valores de heteroziguidade (Machado, 2005). Segundo a autora, em espécies que apresentam estas duas características, acredita-se que sua alta taxa de sobrevivência permita uma uniformidade genética, enquanto que em espécies sem cuidado parental, a maior

Quadro 4 - Número de indivíduos analisados (N), número de locos polimórficos (P), porcentagem de locos polimórficos (P %), número de alelos por loco (K), heteroziguidade média obtida (H_o) e esperada (H_e) das populações de *Hypostomus* analisadas. Em parênteses está o desvio padrão

Variáveis	<i>Hypostomus</i> sp. 1	<i>Hypostomus</i> <i>albopunctatus</i>	<i>Hypostomus</i> <i>hermanni</i>	<i>Hypostomus</i> <i>regani</i>
N	21	13	19	9
P	8	0	8	3
P %	57,14	0,00	57,14	21,43
K	1,785 (0,801)	1,000 (0,000)	1,928 (1,206)	1,214 (0,425)
H_o	0,051 (0,073)	0,000 (0,000)	0,172 (0,262)	0,031 (0,080)
H_e	0,126 (0,158)	0,000 (0,000)	0,199 (0,224)	0,085 (0,183)

possibilidade de sobrevivência seria daqueles indivíduos com genótipos mais diversificados.

Em *H. albopunctatus* ($H_e = 0,031$) e *H. microstomus* ($H_e = 0,023$) do reservatório de Itaipu (Zawadzki et al., 2005), a variabilidade genética foi um pouco maior que aquela encontrada neste trabalho para *H. albopunctatus*. Porém, estes valores ainda são baixos quando comparados com o valor da heterozigosidade média ($H_e = 0,051$) para 195 espécies de peixes de várias partes do mundo (Ward et al., 1992), ou com o valor médio de H_s (0,046) para 49 espécies de peixes de água doce (Ward et al., 1994).

Os valores de H_e para *H. regani* (0,085), *Hypostomus* sp. 1 (0,126) e *H. hermanni* (0,199) deste trabalho, ao contrário de *H. albopunctatus*, foram maiores que as médias encontradas por Ward et al. (1992; 1994). Os valores de H_e em *H. regani* dos reservatórios de Corumbá (Zawadzki, 2001) e Itaipu (Zawadzki et al., 2005), também ficaram acima das médias de Ward et al. (1992; 1994), 0,056 e 0,098, respectivamente. Por estas populações de *H. regani* estarem localizadas em bacias hidrográficas distintas, elas teriam sofrido diferentes taxas de evolução o que poderia ter ocasionado as diferenças nos valores de heterozigosidade.

A heterozigosidade esperada de *Hypostomus* sp. 1 pode ser comparada com aquelas obtidas por Zawadzki et al. (2005) para *H. margaritifera* (0,106) e *Hypostomus* sp. 1 (0,107) do reservatório de Itaipu, ou ainda, com *Hypostomus* sp. 1 (0,143) do ribeirão Keller, um afluente do rio Ivaí (Zawadzki et al., 2004b). Entretanto nenhum destes resultados se aproxima da variabilidade genética relatada para *H. hermanni* deste trabalho, o qual parece ser um dos maiores valores de H_e encontrado para uma espécie de *Hypostomus*. Em *H. hermanni* do ribeirão Keller, o valor da heterozigosidade média foi de apenas 0,068 (Zawadzki et al., 2004b). De acordo com Ward et al. (1994), os valores estimados de heterozigosidade, média esperada para 107 espécies de peixes, variaram entre zero e 0,05 para 54% das espécies, de 0,05 a 0,10 para 30%, de 0,10 a 0,15 para 12% e superior a 0,15 para somente 4% das espécies analisadas. No reservatório de Corumbá, Zawadzki (2001) também verificou uma variação na heterozigosidade entre dez espécies de *Hypostomus* analisadas, as quais variaram de 0,009 em *Hypostomus* sp. 2 a 0,099

em *Hypostomus* sp. 5. Ele relata que os diferentes valores de H_e encontrados evidenciam uma falta de uniformidade nos padrões de variabilidade genética entre as espécies deste gênero.

Esta ampla variação é verificada também em estudos citogenéticos, em que o número cromossômico das espécies deste gênero varia de $2n = 54$ em *H. plecostomus* (Muramoto et al., 1968 apud Artoni e Bertollo, 2001) a $2n = 84$ em *Hypostomus* sp. 2 (Cereali, 2006), além de apresentar alterações em suas fórmulas cariotípicas.

Embora *Hypostomus* sp. 1 tenha apresentado alelos exclusivos e a mesma porcentagem de locos polimórficos que *H. hermanni*, o índice mais alto de variabilidade genética foi encontrado nesta última espécie devido a um maior número de alelos por loco (1,928) (Quadro 4) como, por exemplo, nos locos Est-2 e Sod-A.

As esterases, enzimas que hidrolisam ésteres de ácido carboxílico, são freqüentemente polimórficas. Lapenta et al. (1999) em um estudo do padrão de esterase em *H. albopunctatus*, como citado acima, verificaram três formas alélicas em EST-4 e duas em EST-2 e EST-3. Em *Prochilodus lineatus*, Est-1 apresentou quatro alelos e Est-2 três alelos (Revaldaves et al., 1997). Enquanto que neste trabalho foi verificado no loco Est-2, cinco alelos em *H. hermanni* e três em *Hypostomus* sp. 1. Contudo, casos de locos monomórficos para esterase são relatados na família Loricariidae em *Loricariichthys platymetopon* e *Loricariichthys* sp. das bacias do estado do Paraná, e *Loricariichthys anus* de uma lagoa do Rio Grande do Sul (Zawadzki et al., 2000), além de algumas espécies de peixes da bacia Amazônica, como o tucunaré (Teixeira e Oliveira, 2002) e pirarucu (Teixeira, 2002). Monomorfismo foi encontrado também no loco Est-2 deste trabalho para *H. albopunctatus* e *H. regani*, contrastando com *Hypostomus* sp. 1 e *H. hermanni*.

Ao contrário da esterase, a enzima superóxido dismutase é raramente polimórfica (Ward et al., 1992). Porém, na população de *H. hermanni*, oito exemplares foram heterozigotos para Sod-A. Em loricarídeos, esta enzima é geralmente monomórfica, caso de *H. hermanni* do ribeirão Keller (Zawadzki et al.,

2004b). Já em outras famílias como a Anostomidae, três alelos foram detectados para o loco *Sod-1* na espécie *Leporinus lacustris* (Peres e Renesto, 2005a).

De acordo com Ayala (1976), a existência de alelos múltiplos reflete a variabilidade hereditária de uma população e representa um pré-requisito para mudanças evolutivas, pois, se todos os indivíduos fossem homozigotos para um mesmo alelo de um determinado loco, não poderia ocorrer evolução neste loco até que surgisse um novo alelo por mutação. Se ao contrário, existirem dois ou mais alelos em uma população, a frequência de um alelo pode aumentar as custas das dos outros, como resultado da seleção natural ou de outros fatores evolutivos. Assim, uma população com quantidades consideráveis de variabilidade genética, pode se proteger em relação a futuras mudanças do ambiente.

Vida (1994) relata que “o futuro da manutenção da diversidade de espécies está na diversidade genética das espécies. Em geral, quanto maior diversidade genética for mantida, maior a adaptabilidade e, conseqüentemente, a probabilidade de sobrevivência de uma espécie num ambiente inconstante”. Por isso, informações referentes à variabilidade genética de uma espécie são essenciais na adoção de medidas para sua conservação, como no caso de alterações resultantes da formação de reservatórios.

Revaldaves et al. (1997), no estudo da variabilidade de subpopulações de *Prochilodus lineatus* da bacia do alto rio Paraná, no trecho acima do reservatório de Itaipu, verificaram que o alto nível de heterozigosidade (13%) e polimorfismo contribuem para que esta área seja adequada para coleta de estoques fundadores desta espécie.

Em tambaqui (*Colossoma macropomum*) da Amazônia Central, foram analisados os padrões das enzimas esterases e superóxido dismutase para complementar estudos de identificação e delimitação de “estoques naturais”. Pois a implantação de técnicas de re-povoamento para manejo alternativo de sua pesca poderia gerar uma mistura de exemplares de diferentes áreas geográficas, já que o perfil genético dos peixes nativos era desconhecido (Teixeira e Oliveira, 2004).

Estudos sobre a ictiofauna da região do reservatório de Itaipu antes do represamento registraram 113 espécies, sendo o gênero *Hypostomus* o mais

coletado, com uma frequência de aproximadamente 40% (Itaipu Binacional, 1981). Em levantamentos após a formação do reservatório, 107 espécies foram coletadas (Agostinho et al., 1992), porém a frequência deste gênero diminuiu drasticamente para menos de 10%. Se um levantamento da variabilidade genética destes peixes fosse realizado anteriormente para um plano de manejo, talvez eles não apresentassem uma queda tão drástica na sua abundância. No rio Ivaí, já foram coletadas 67 espécies de peixes (Penczak et al., 1998), dentre elas cinco são do gênero *Hypostomus* (*H. albopunctatus*, *H. derbyi*, *H. regani*, *Hypostomus* sp. e *Hypostomus* sp. b), no entanto, sua abundância não é tão expressiva como no reservatório de Itaipu. Todavia, em coletas para realização deste trabalho foram encontradas além das espécies aqui analisadas, mais três espécies (*H. margaritifera*, *H. aff. strigaticeps* e *Hypostomus* sp. 3), porém não em número suficiente para uma análise adequada.

Assim, levando em consideração a possível utilização do rio Ivaí para produção de energia, a partir da construção de reservatórios no canal principal (SUDERHSA, 1998; ANA e MMA, 2006; MT, 2006; SUREHMA e GTZ, 1992 apud Penczak et al., 1998), revela-se de grande importância o conhecimento da quantidade e a distribuição dos tipos de variações e divergências genéticas existentes nas populações de peixes a fim de melhor assegurar a preservação dos seus recursos genéticos (Toledo-Filho et al., 1992), bem como, garantir o manejo para manutenção da sua abundância.

A partir das frequências gênicas os valores de identidade (I) e distância (D) genética foram calculados (Quadro 5) e observou-se que as populações mais divergentes geneticamente foram *Hypostomus* sp. 1 e *H. hermanni* ($D = 0,563$). A distância genética de Nei (1978) estima o número médio de substituições de nucleotídeos por loco, detectáveis por eletroforese e acumuladas nas populações desde que elas divergiram de um ancestral comum, ou seja, a substituição é proporcional ao tempo evolutivo (Dobzhansky et al., 1977; Thorpe, 1982; Thorpe e Solé-Cava, 1994). Desta forma, é possível dizer que a cada 1000 locos as populações citadas diferem em 563 códons, os quais provavelmente foram substituídos após a divergência de seu ancestral.

Ao contrário da distância, a identidade genética representa a proporção dos produtos dos genes que não são diferenciados por procedimento eletroforético (Dobzhansky et al., 1977) e seu valor varia de 0 a 1. Segundo Thorpe (1982), 85% dos valores de I entre espécies do mesmo gênero excedem 0,35 e 97% dos valores estão abaixo de 0,85. Entre espécies de gêneros diferentes este valor, em 77% dos casos, é menor que 0,35, enquanto que para populações da mesma espécie 98% excede 0,85. Estes valores comparados com a similaridade entre *Hypostomus* sp. 1 e *H. hermanni* (I = 0,569), *H. albopunctatus* (I = 0,711) e *H. regani* (I = 0,768) corroboram a distinção entre este morfótipo e as três espécies.

Um dendrograma calculado a partir da distância genética existente entre as populações aqui estudadas está representado na Figura 8. As populações de *H. albopunctatus* e *H. regani* foram as mais similares (D = 0,218). Uma análise destas mesmas espécies, coletadas no reservatório de Itaipu (Zawadzki et al., 2005), apresentou valores praticamente iguais de distância (D = 0,219) e identidade genética (I = 0,803), apesar de um número maior de sistemas enzimáticos (14 - AAT, ACP, ADH, GCPDH, GPI, G6PDH, G3PDH, ICDH, LDH, MDH, MDHP, PER, PGM e SOD) e, conseqüentemente, de locos (25) terem sido estudados. Os autores verificaram que as duas espécies foram agrupadas em um mesmo clado (B2), assim como *H. albopunctatus* e *H. regani* do rio Ivaí. Este fato reafirma a colocação de Thorpe e Solé-Cava (1994), de que existe uma clara relação entre divergência taxonômica e distância genética. Caso contrário, os dados de I e D entre

Quadro 5 - Valores da distância (D) e identidade (I) genética de Nei (1978), indicados respectivamente, abaixo e acima da linha diagonal, para as quatro populações de *Hypostomus* do rio Ivaí

Espécimes	1	2	3	4
1 - <i>Hypostomus</i> sp. 1	—	0,711	0,569	0,768
2 - <i>H. albopunctatus</i>	0,341	—	0,583	0,804
3 - <i>H. hermanni</i>	0,563	0,539	—	0,734
4 - <i>H. regani</i>	0,264	0,218	0,308	—

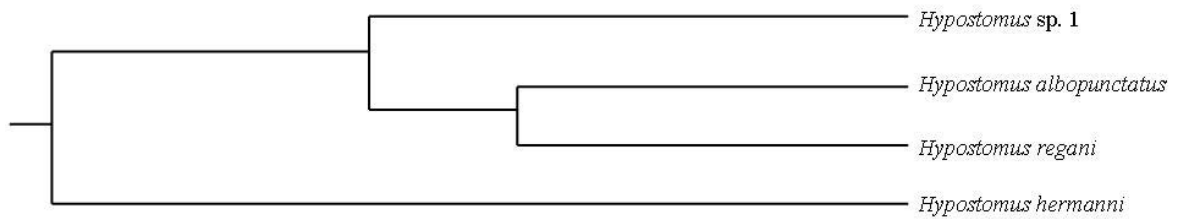


Figura 8 - Dendrograma de UPGMA calculado a partir da distância genética de Nei (1978) entre as quatro populações de *Hypostomus* estudadas no rio Ivaí.

estas populações poderiam apresentar valores discrepantes.

Contudo, Montoya-Burgos (2003) através de dados de regiões de mtDNA (D-loop) e ITS (Internal Transcribed Spacer), separou *H. regani* e *H. albopunctatus* da bacia do rio Paraná, em clado D3 e clado D4, respectivamente, embora a análise tenha sido realizada com várias outras espécies o que pode influenciar nos resultados. Isto evidencia a complexidade para obtenção de dados sobre as relações genéticas e conseqüentemente evolutivas, entre as espécies de *Hypostomus*.

Os dados deixam claro que diferenças significantes foram encontradas entre os quatro conjuntos gênicos analisados, evidenciando um isolamento reprodutivo entre eles e indicando que estas populações sintópicas do rio Ivaí, são espécies biológicas verdadeiras.

5. CONCLUSÕES

Os dados de isoenzimas indicam que o morfótipo *Hypostomus* sp. 1 do rio Ivaí, difere das espécies *H. hermanni*, *H. albopunctatus* e *H. regani*, ou seja, representam unidades genéticas distintas, o que corresponde a um isolamento reprodutivo das populações analisadas.

Os índices de variabilidade genética das quatro espécies são diversificados, assim como de populações deste gênero de outras localidades. Esta ampla variação evidência a dificuldade de identificação e possíveis inferências filogenéticas deste grupo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR., H.F.; BORGHETTI, J.R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. **Revista Unimar**, 14:89-107, 1992. Suplemento.

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR., H.F.; GOMES, L.C.; BINI, L.M.; AGOSTINHO, C.S. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (eds.). **A planície de inundação do alto Rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, Nupelia, 1997. p. 179-208.

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR., H.F. Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná. In: LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Tradução: Vazzoler, A.E.A.M.; Agostinho, A.A.; Cunnigham, P.T.M. São Paulo: Edusp, 1999. p. 374-400.

AGOSTINHO, A.A.; BINI, L.M.; GOMES, L.C.; JÚLIO JR., H.F.; PAVANELLI, C.S.; AGOSTINHO, C.S. Fish of Assemblages. In: THOMAZ, S.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (eds.). **The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, 2004. p. 223-246.

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, S.A.; SODRÉ, L.M.K. Analysis of genetic variability in three species of Pimelodidae (Ostariophysi - Siluriformes). **Genet. Mol. Biol.**, 21:487-492, 1998.

ANA - AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Cadernos de recursos hídricos. **A navegação interior e sua interface com o setor de recursos hídricos**. Brasília: SUM, 2005. 49p.

ARMBRUSTER, J.W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and Ancistrinae. **Zool. J. Linn. Soc.**, 141:1-80, 2004.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryologia**, 49:81-90, 1996.

ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, 134:201-210, 2001.

AVISE, J.C. Systematic value of electrophoretic data. **Syst. Zool.**, 23:465-481, 1975.

AYALA, F.J. **Molecular evolution**. Sunderland: MA Sinauer Associates. 1976. 277p.

BOYER, S.H.; FAINER, D.C.; NAUGHTON, M.A. Myoglobin inherited structural variation in man. **Science**, 140:1228-1231, 1963.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal. Manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 1999. 184p.

BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M.S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, Londrina, 2006. CD-ROM: **Resumos...** Londrina: UEL / Unifil / SBG, 2006.

BUTH, D.G.; MURPHY, R.W. The use of isozyme characters in systematic studies. **Bioch. Syst. Ecol.**, 27:117-129, 1999.

CEREALI, S.S. **Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriformes) do planalto da Bodoquena - Mato Grosso do Sul**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2006. 99p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular).

CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Genetic variability in five species of Anostomidae (Ostariophysi - Characiformes). **Genet. Mol. Biol.**, 22:517-523, 1999.

DELARIVA, R.L.; AGOSTINHO, A.A. Relationship between morphology and diets of six neotropical loricariids. **J. Fish Biol.**, 58:832-847, 2001.

DOBZHANSKY, T.; AYALA, F.J.; STEBBINS, G.L.; VALENTINE, J.W. **Evolution**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1977. 572p.

FERRARIS JR., C.J. Family Loricariidae: subfamily Neoplecostominae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. **Check list of the freshwater fish of south America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 319-320.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220p.

FISCH-MULLER, S. Family Loricariidae: subfamily Ancistrinae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. **Check list of the freshwater fish of south America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 373-400.

FUGI, R. **Estratégias alimentares utilizadas por cinco espécies de peixes comedoras de fundo do alto rio Paraná/PR-MS**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1993. 141p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais).

GARAVELLO, J.C.; PAVANELLI, C.S.; SUZUKI, H.I. Caracterização da ictiofauna do rio Iguaçu. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. (eds.). **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM / Nupelia, 1997. p. 61-84.

GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae)**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1998. p. 78. Tese (Doutorado em Genética e Evolução).

GRAÇA, W.J. **Caracterização morfológica dos peixes da planície de inundação do alto rio Paraná-MS**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2004. p. 258. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais).

HAHN, N.S.; ANDRIAN, I.F.; FUGI, R.; ALMEIDA, V.L.L. Ecologia trófica. In: VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (eds.). **A planície de inundação do Alto Rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, Nupelia, 1997. p. 209-228.

HAHN, N.S.; FUGI, R.; ANDRIAN, I.F. Trophic ecology of the fish assemblages. In: THOMAZ, S.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (eds.). **The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, 2004. p. 247-269.

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

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Nomenclature Committee, Enzyme Nomenclature 1992**. San Diego: Academic Press, 1992.

ITAIPU BINACIONAL. **Ictiofauna**. Complementação do inventário ictiofaunístico. São Paulo: CETESB, 1981. 89p.

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, 94:180-186, 2005.

LAPENTA, A.N.; ZAWADZKI, C.H.; RENESTO, E.; OKADA, E.K.; SUZUKI, H.I. Padrão eletroforético das esterases em *Hypostomus albopunctatus* (Regan, 1907) da bacia do rio Paraná e *H. aff. albopunctatus* (Pisces: Siluriformes: Loricariidae) da bacia do rio Iguaçu. **Genetics and Molecular Biology - Programas e Resumos - 45º Congresso Nacional de Genética**, 22:600, 1999. Supplement.

LARA-KAMEI, M.C.S.; JÚLIO JR., H.F. Diversidade cromossômica em espécies do gênero *Hypostomus* (Loricariidae, Hypostominae) de um riacho da bacia do Rio Paraná. In: IX SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, Maringá, 2002. **Resumos...** Maringá: UEM, 2002. p. 63.

LEVY, J.A.; CASSANO, V.P.F. Biochemical-genetic comparison of *Cynoscion jamaicensis* and *Cynoscion striatus* (Teleostei: Perciformes: Sciaenidae) in south Brazil. **Comp. Biochem. Physiol.**, 107:515-517, 1994.

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

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Tradução: VAZZOLER, A.E.A.; AGOSTINHO, A.A.; CUNNIGHAM, P.T.M. São Paulo: Edusp, 1999. 534p.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 2ª ed. Rio de Janeiro: José Olympio, 1981. 450p .

MACHADO, M.D.P.L. **Análise isoenzimática da variabilidade genética de peixes da planície de inundação do Alto Rio Paraná**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005. 62p. Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais).

MACHADO, M.F.P.S.; COLLET, S.A.O.; MANGOLIN, C.A. **Expressão gênica no desenvolvimento de tecidos vegetais *in vitro***. Maringá: EDUEM, 1999. 95p.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 45:753-763, 1959.

MARTINEZ, E.R.M.; PAIVA, L.R.S.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Análise citogenética de duas espécies do gênero *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) do rio Ivaí, Paraná. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, Londrina, 2006. CD-ROM: **Resumos...** Londrina: UEL / Unifil / SBG, 2006.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1963. 797p.

MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. Tradução: REICHARDT, H. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1977. 485p.

MIYAMOTO, C.T. **Aspectos reprodutivos de espécies de teleósteos da bacia do rio Paraná: uma revisão**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1990. p.108. Especialização (Monografia em Ecologia de Água Doce).

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.

MONTOYA-BURGOS, J.I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Mol. Ecol.**, 12: 1855-1867, 2003.

MT - MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES. **Informações sobre o rio Ivaí**. Disponível em: <http://www.transportes.gov.br/bit/hidro/grioivai.htm>. Acesso em: 17, setembro, 2006.

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

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001. 378p.

NEI, M. Genetic distance between populations. **Amer. Natur.**, 106:283-291, 1972.

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

- NELSON, J.S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley, 1984. 537p.
- PAIVA, M.P. **Grandes represas do Brasil**. Brasília: Editerra, 1982. 304p.
- PAIVA, S.; MARTINEZ, E.R.M.; ZAWADZKI, C.H.; RENESTO, E.; PAIVA, L.R.S. Evidências bioquímicas de novas espécies de peixes do gênero *Hypostomus* (Pisces: Loricariidae) do Rio Manso (MT). In: 47º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, Águas de Lindóia, 2001. CD-ROM: **Resumos...** Águas de Lindóia: SBG, 2001. p. 104.
- PAIVA, S.; LAPENTA, A.S.; ZAWADZKI, C.H. Padrões de esterases em quatro espécies do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Pisces: Teleostei: Loricariidae) do reservatório de Itaipu. In: 49º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, Águas de Lindóia, 2003. CD-ROM: **Resumos...** SBG, 2003. p.55.
- PAIVA, S.; RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H. Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, 28:370-375, 2005.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. **Practical isozyme genetics**. Chichester: Ellis Horwood, 1988. 215p.
- PENCZAK, T.; GOMES, L.C.; BINI, L.M.; AGOSTINHO, A.A. The importance of qualitative inventory sampling using electric fishing and nets in a large, tropical river (Brazil). **Hydrobiologia**, 389:89-100, 1998.
- 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 Scient. Biol. Sci.**, 27:79-84, 2005a.
- PERES, M.D.; VASCONCELOS, M.S.; RENESTO, E. Genetic variability in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, 28:717-724, 2005b.

PY-DANIEL, L.H.R. **Sistemática dos Loricariidae (Ostariophysi, Siluroidei) do complexo de lagos do Janauacá, Amazonas e aspectos da sua biologia e ecologia.** Manaus: INPA, 1984. p. 278. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas).

PY-DANIEL, L.H.R.; FERNANDES, C.C. Dimorfismo sexual em Siluriformes e Gymnotiformes (Ostariophysi) da Amazônia. **Acta Amaz.**, 35:97-110, 2005.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. **Check list of the freshwater fish of south America.** Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 642p.

REIS, R.E.; PEREIRA, E.H.L.; ARMBRUSTER, J.W. Delterinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zool. J. Linn. Soc.**, 147:277-299, 2006.

RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H.; REVALDAVES, E. Biochemical taxonomy of *Crenicichla* (Pisces: Perciformes: Cichlidae) of the Iguaçú River, Brazil. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, 44:15-22, 2001.

REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Braz. J. Genet.**, 20:381-388, 1997.

SANTOS, G.M.; JÉGU, M.; MERONA, B. **Catálogo de peixes comerciais do baixo rio Tocantins, projeto Tucuruí.** Manaus: ELETRONORTE: INPA; Brasília: CNPq, 1984, 83p.

SCHAEFER, S.A. Family Loricariidae: subfamily Hypoptomatinae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. **Check list of the freshwater fish of south America.** Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 321-329.

SUDERHSA - SUPERINTENDÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Qualidade das águas interiores do Estado do Paraná 1987 – 1995.** Curitiba, 1997. 257p.

SUDERHSA - SUPERINTENDÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Atlas de recursos hídricos do Estado do Paraná**. Curitiba, 1998. 27p.

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

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

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

SUZUKI, H.I.; AGOSTINHO, A.A.; WINEMILLER, K.O. Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in locariid catfishes of the Paraná River, Brazil. **J. Fish Biol.**, 57:791-807, 2000.

SUZUKI, H.I.; VAZZOLER, A.E.A.M.; MARQUES, E.E.; LIZAMA, M.A.P.; INADA, P. Reproductive ecology of the fish assemblages. In: THOMAZ, S.M., AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (eds.). **The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, 2004. p. 271-291.

TEIXEIRA, A.S. Padrões genotípicos de transferrina e esterases (esterase e esterase-D) de pirarucu, *Arapaima gigas*, do lago Santa Cruz, rio Tefé, Amazonas. In: IX SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, Maringá, 2002. **Resumos...** Maringá: UEM, 2002. p.164.

TEIXEIRA, A.S.; OLIVEIRA, S.S. Padrões de esterases (esterase e esterase-D) em tucunarés (*Cichla monoculus*, *Cichla temensis* e *Cichla* sp) da Amazônia Central. In: IX SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, Maringá, 2002. **Resumos...** Maringá: UEM, 2002. p.165.

TEIXEIRA, A.S.; OLIVEIRA, S.S. Polimorfismo genético de esterase e superóxido dismutase em tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) da Amazônia

Central. In: X SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, Natal, 2004. **Resumos...** Natal: UFRN / SBG, 2004. p.25.

TEIXEIRA, A.S.; NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Esterase-D and chromosome patterns in Central Amazon piranha (*Serrasalmus rhombeus* Linnaeus, 1766) from Lake Catalão. **Genet. Mol. Biol.**, 29:498-502, 2006.

THORPE, J.P. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, 13:139-168, 1982.

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

TOLEDO-FILHO, S.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; GALHARDO, E.; DONOLA, E. **Cadernos de ictiogenética - Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios**. São Paulo: USP - Coordenadoria de Comunicação Social, 1992. 39p.

VIDA, G. Global issues of genetic diversity. In: LOESCHCKE, V.; TOMIUK, J.; JAIN, S.K. (eds.). **Conservation genetics**. Basel: Birkhauser Verlag, 1994. p. 9-19.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. **Popgene version 1.31**. Microsoft Window - Based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research. 1999.

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

WARD, R.D.; WOODWARK, M.; SKIBINSKI, D.O.F. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromus fishes. **J. Fish Biol.**, 44:213-232, 1994.

WEBER, C. Family Loricariidae: subfamily Hypostominae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. **Check list of the freshwater fish of south America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 351-372.

ZAWADZKI, C.H. **Sistemática e variação aloenzimática da família Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) dos reservatórios de Corumbá e Itaipu, bacia do alto rio Paraná, Brasil.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2001. 59p. Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais).

ZAWADZKI, C.H.; RENESTO, E.; BINI, L.M. Genetic and morphometric analysis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the Rio Iguaçu basin (Brazil). **Rev. suisse de Zool.**, 106:91-105, 1999.

ZAWADZKI, C.H.; REIS, R.E.; RENESTO, E. Allozyme discrimination of three species of *Loricariichthys* (Siluriformes: Loricariidae) from southern Brazil. **Rev. suisse de Zool.**, 107:663-674, 2000.

ZAWADZKI, C.H.; MACHADO, M.F.P.S.; RENESTO, E. Differential expression for tissue-specific isozymes in the three species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei: Loricariidae). **Bioch. Syst. Ecol.**, 29:911-922, 2001.

ZAWADZKI, C.H.; WEBER, C.; PAVANELLI, C.S.; RENESTO, E. Morphological and biochemical comparison of two allopatrid populations of *Hypostomus margaritifer* (Regan, 1907) (Osteichthyes, Loricariidae) from the upper Paraná River basin, Brazil. **Acta Scient.**, 24: 499-505, 2002.

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 Paraná basin, Brazil. **Biochem. Syst. Ecol.**, 32:573-582, 2004a.

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. **Genetica**, 121:251-257, 2004b.

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