

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS**

JUDY RUIZ REZENDE

Variabilidade genética de *Gymnotus inaequilabiatus* (Valenciennes, 1839)

(Osteichthyes, Gymnotiformes), da planície de inundação do alto rio

Paraná e do rio Paraguai

JUDY RUIZ REZENDE

Variabilidade genética de *Gymnotus inaequilabiatus* (Valenciennes, 1839)
(Osteichthyes, Gymnotiformes), da planície de inundação do alto rio Paraná e do
rio Paraguai

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais
Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Renesto

Maringá
2007

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

- R467v Rezende, Judy Ruiz, 1981-
Variabilidade genética de *Gymnotus inaequilabiatus* (Valenciennes, 1839) (Osteichthyes, Gymnotiformes), da planície de inundação do alto rio Paraná e do rio Paraguai / Judy Ruiz Rezende. -- Maringá, 2007.
19 f. : il. (algumas color.).
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2007.
Orientador: Prof. Dr. Erasmo Renesto.
1. *Gymnotus inaequilabiatus* (Valenciennes, 1839) (Osteichthyes : Gymnotiformes) "morenita", "tuvira", "sarapó" - Variabilidade genética - Isoenzimas - Planície de inundação - Alto rio Paraná. 2. *Gymnotus inaequilabiatus* (Valenciennes, 1839) (Osteichthyes : Gymnotiformes) "morenita", "tuvira", "sarapó" - Variabilidade genética - Isoenzimas - Planície de inundação - Paraguai, Rio, Bacia. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em "Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais".

CDD 22. ed. -597.4813509816
NBR/CIP - 12899 AACR/2

FOLHA DE APROVAÇÃO

JUDY RUIZ REZENDE

Variabilidade genética de *Gymnotus inaequilabiatus* (Valenciennes, 1839)
(Osteichthyes, Gymnotiformes), da planície de inundação do alto rio Paraná e do
rio Paraguai

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes
Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre
em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Erasmo Renesto
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr.^a Leda Maria Koelblinger Sodré
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr.^a Maria Cláudia Colla R. Takasusuki
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em : 19 de março de 2007.

Local de defesa: Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Ao meu orientador Prof. Dr. Erasmo Renesto pela confiança, compreensão e dedicação durante todo o curso.

Ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA) pelo curso de pós-graduação e apoio na coleta dos peixes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa em nível de Mestrado e apoio financeiro na aquisição de reagentes.

A todos os professores do PEA.

Aos colegas de curso.

Aos colegas de laboratório.

Aos funcionários da secretaria do PEA.

Aos mestrandos Caroline Yamamura e João Paulo Alves Pagotto, pelo auxílio e organização da coleta de parte dos espécimes de peixes utilizados neste trabalho.

Ao doutorando Weferson Júnior da Graça, pela identificação dos espécimes de peixes.

Ao meu marido Jorge Henrique, por me apoiar e entender minha ausência durante o último ano do curso.

À minha família, pelo amor, carinho e incentivo.

Aos meus amigos Fabiana e Christiano pela motivação e amizade sincera.

E a todos os amigos que vibraram positivamente para que eu pudesse concluir esta etapa.

Variabilidade genética de *Gymnotus inaequilabiatus* (Valenciennes, 1839) (Osteichthyes, Gymnotiformes), da planície de inundação do alto rio Paraná e do rio Paraguai

RESUMO

Gymnotus inaequilabiatus (Valenciennes, 1839) se distribui pela bacia Paraná-Paraguai e algumas drenagens costeiras do Uruguai e sudeste do Brasil. Habita regiões com gramíneas e áreas com macrófitas flutuantes em pequenos rios e ao longo de margens de rios maiores de águas escuras. É popularmente conhecido como; morenita, tuvira ou sarapó, e não é uma espécie migradora. De dezembro de 2005 a março de 2006 foram coletados 63 espécimes na planície de inundação do alto rio Paraná e 30 no rio Paraguai. Foram analisados 10 sistemas enzimáticos (AAT: Aspartato amino transferase, EST: Esterase, ADH: Alcool desidrogenase, GDH: Glicose desidrogenase, SOD: Superóxido dismutase, LDH: Lactato desidrogenase, G3PDH: Glicerol-3-fosfato desidrogenase, MDH: Malato desidrogenase, SORB: Sorbitol desidrogenase, IDH: Isocitrato desidrogenase) por meio da técnica de eletroforese em gel de amido. 17 *loci* foram detectados em cada população. A população da planície de inundação do alto rio Paraná foi a que apresentou a maior variabilidade genética, tanto pela frequência de *loci* polimórficos (76,47%), quanto pelo número médio de alelos por *locus* ($2,12 \pm 0,86$) e heterozigosidade esperada ($0,2415 \pm 0,2072$). Foram detectados 14 alelos exclusivos para a população da planície de inundação do alto rio Paraná: *Adh-1(b)*, *Adh-(c)*, *Est-1(a)*, *Est-2(a)*, *Gdh-1(a)*, *Gdh-1(c)*, *Idh-1(b)*, *Ldh-B(a)*, *Mdh-A(c)*, *Sod-1(b)*, *Sod-2(b)* e *Sorb-1(b, c, d)*. As duas populações diferem significativamente quanto às frequências alélicas em 11 dos 17 *loci*. A identidade e a distância genética de Nei entre as populações da planície de inundação do alto rio Paraná e do rio Paraguai foram $I = 0,7889$ e $D = 0,2246$, respectivamente. Os dados indicam que as populações de *G. inaequilabiatus* da planície de inundação do alto rio Paraná e do rio Paraguai estão em processo de divergência genética e podem futuramente se tornar espécies distintas. Um projeto de manejo desta espécie deveria evitar o fluxo gênico entre elas.

Palavras-chave: Isoenzimas. Variabilidade genética. *Gymnotus inaequilabiatus*. Gymnotiformes. Planície de inundação.

Genetic variability of *Gymnotus inaequilabiatus* (Valenciennes, 1839) (Osteichthyes, Gymnotiformes) from upper Paraná River floodplain and of the Paraguay River

ABSTRACT

Gymnotus inaequilabiatus (Valenciennes, 1847) is distributed across the Paraná-Paraguai basin and in some coasts drainages of Uruguai and in southeast of Brazil. It inhabits either areas with grasses or floating macrophytes in small rivers and along the banks of larger dark water rivers. In Brazil, the common names of this species are; morenita, tuvira and sarapó, and it isn't a migratory species. From December 2005 until March 2006, 63 specimens were collected at upper Paraná River floodplain and 30 at Paraguay River. Ten enzyme systems (AAT: Aspartate aminotransferase, EST: Esterase, ADH: Alcohol dehydrogenase, GDH: Glucose dehydrogenase, SOD: superoxide dismutase, LDH: lactate dehydrogenase, G3PDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, MDH: Malate dehydrogenase, SORB: Sorbitol dehydrogenase, IDH: Isocitrate dehydrogenase) were analyzed by starch gel electrophoresis technique. Seventeen *loci* were detected for each population. The population of upper Paraná River floodplain stream showed the biggest genetic variability either by proportion of polymorphic *loci* (76.47%), or by average number of alleles by *locus* ($2,12 \pm 0,86$) and expected heterozygosity ($0,2415 \pm 0,2072$). Some alleles were detected only in the upper Paraná River floodplain population: *Adh-1(b)*, *Adh-(c)*, *Est-1(a)*, *Est-2(a)*, *Gdh-1(a)*, *Gdh-1(c)*, *Idh-1(b)*, *Ldh-B(a)*, *Mdh-A(c)*, *Sod-1(b)*, *Sod-2(b)* e *Sorb-1(b, c, d)*. The allele frequencies in the two populations are significantly different at 11 of the 17 *loci*. The Nei's genetic identity and genetic distance between the populations were $I = 0,7889$ and $D = 0,2246$, respectively. The data indicate these populations of the *G. inaequilabiatus* are diverging genetically and could be two distinct species in the future. A management program should inhibit the gene flux between them.

Keywords: Isozymes. Genetic variability. *Gymnotus inaequilabiatus*. Gymnotiformes. Floodplain.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica Genetics and Molecular Biology. Disponível em: <http://www.gmb.org.br/instructions_to_authors.html>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	15
REFERÊNCIAS	17

INTRODUÇÃO

O gênero *Gymnotus* Linnaeus, 1758 (Pisces: Gymnotiformes) possui a maior distribuição geográfica de todos os Gymnotiformes, se estendendo do rio Salado dos Pampas da Argentina (36°S) para o rio San Nicolas do sudeste de Chiapas no México (18°N), e está presente em águas continentais de todos os países da América do Sul e Central, exceto no Chile e Belize (Albert, 2001).

G. inaequilabiatus (Valenciennes, 1839) é encontrada na bacia dos rios Paraná e Paraguai e em algumas drenagens costeiras do Uruguai e sudeste do Brasil. Habita regiões com gramíneas e áreas com macrófitas flutuantes em pequenos rios e ao longo de margens de rios maiores de águas escuras (Fernandes *et al.*, 2005). As espécies de *Gymnotus* são popularmente conhecidas como; morenita, tuvira ou sarapó, e não são migradoras.

A tuvira representa metade da produção de iscas que é comercializada para pescadores esportivos da região de Corumbá (MS). Nesta região o comércio de iscas tem grande importância econômica e social para os comerciantes de iscas e suas famílias, mas a quantidade de iscas está diminuindo a cada ano (Catella, 2003). De acordo com Rotta, 2004, a utilização de *Gymnotus* vem ocorrendo de maneira irracional e pode gerar alterações na estrutura de suas populações e no ambiente onde elas são capturadas.

Compreender os efeitos da variabilidade genética em peixes é de fundamental importância para entender como a diversidade é distribuída entre populações. Métodos genéticos de manejo, conservação e criação de peixes, por exemplo, são dependentes do conhecimento da quantidade de variação dentro de uma unidade local reprodutiva (Carvalho, 1993).

Altos índices de heterozigiosidade em uma espécie revelam maior adaptabilidade às variações ambientais (plasticidade), uma vez, que seu patrimônio genético é mais diversificado. Em resposta as pressões ambientais, enzimas-chave do metabolismo podem atuar de maneira diferente aumentando a capacidade da espécie de explorar nichos ecológicos que *a priori* lhes seriam desfavoráveis (Morales, 2000).

Uma vez que *G. inaequilabiatus* é uma espécie não migradora, as populações do rio Paraná e Paraguai não se misturam, a não ser por transporte humano. Deste modo, diferentes variantes genéticas que promovem adaptações locais podem ter se fixado nas duas populações. Peixes coletados no rio Paraguai são vendidos como iscas para serem utilizadas

no rio Paraná e podem se misturar com a população deste rio causando a perda de adaptações locais.

O objetivo deste trabalho é avaliar o grau de diferença genética entre as populações do rio Paraná e Paraguai e as conseqüências genéticas desta possível mistura entre elas, bem como, fornecer subsídios para um programa de criação desta espécie em cativeiro sugerida por Rotta, 2004.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta dos espécimes foi realizada no período de dezembro de 2005 a março de 2006. Neste período foram capturados 93 espécimes sendo; 30 do rio Paraguai (Figura 1) obtidos de pescadores da região de Corumbá, MS; 55 indivíduos do riacho Caracu, (Figura 2), e 8 do rio Ivinheima (Figura 2). Todos os espécimes foram identificados como *Gymnotus inaequilabiatus* pelos pesquisadores do Museu de Ictiologia do Nupelia (Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura da Universidade Estadual de Maringá).



Figura 1. Mapa Hidrográfico do Mato Grosso do Sul. O rio Paraguai está destacado em azul.

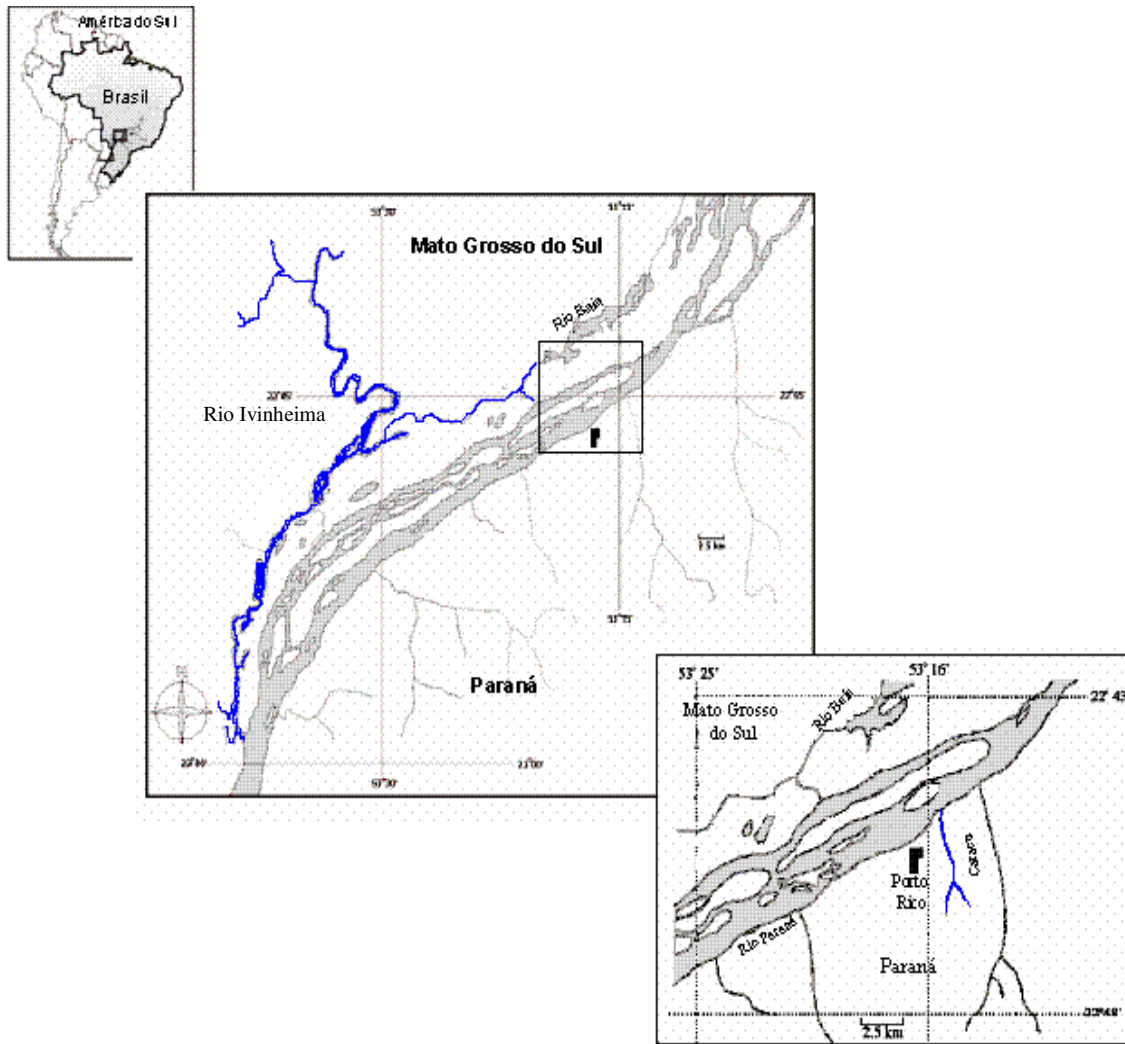


Figura 2. Mapa hidrográfico da Planície de Inundação do alto rio Paraná. O rio Ivinheima e o riacho Caracu estão destacados em azul.

Imediatamente após a coleta, os tecidos das brânquias, fígado, músculo esquelético branco, e rins foram removidos dos peixes, e congelados em nitrogênio líquido a -196°C . Para as análises eletroforéticas, amostras dos tecidos foram maceradas com bastão de vidro em microtubos de 1,5 ml com 100 μL Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5. Devido a presença de grande quantidade de gordura no fígado foi adicionado tetracloreto de carbono (CCl_4) (Pasteur *et al.*, 1988) na proporção de 1:2 (tecido: CCl_4), para ocorrer a sua precipitação. Os tubos foram centrifugados a 25.000 rpm (44720 $\times g$), com temperatura entre 1°C a 5°C , durante 30 minutos. O extrato protéico (sobrenadante) foi aplicado no gel de amido de milho (Val *et al.*, 1981) embebido em pequenas tiras de papel-filtro de 3mm de largura. Em seguida, o gel foi submetido à eletroforese horizontal contínua, sob refrigeração, durante sete e quatorze horas dependendo do sistema tampão (Tabela 1). A corrente elétrica nos géis, medida através de suas extremidades com um multímetro, foi de aproximadamente 100 V nas eletroforeses de 7 horas de duração e 50 V nas eletroforeses de 14 horas de duração.

Tabela 1. Condições experimentais utilizadas para análise de 10 sistemas isoenzimáticos testados para as populações de *Gymnotus inaequilabiatus*.

Isoenzima	Tecido	Tampão do gel e da cuba	Duração	Referências
AAT, EST, ADH, SOD	Fígado Rim	Tris/borato/EDTA 0,045/0,025/0,001M, pH 8,6	7 horas	Boyer <i>et al.</i> , (1963)
LDH, G3PDH, MDH, SORB	Fígado Rim	Tris/citrato 0,009/0,003M, pH 7,0	14 horas	Shaw and Prasad (1970)
IDH, MDH	Fígado Músculo Brânquia	Tris/citrato 0,009/0,003M, pH 7,0	14 horas	Shaw and Prasad (1970)

Os tecidos e tampões utilizados para os testes estão especificados na Tabela 1 e os dez sistemas enzimáticos testados em gel de amido estão descritos na Tabela 2. Para visualização das isoenzimas foram utilizados os procedimentos padrões de revelação baseados nos protocolos de Aebersold *et al.* (1987). A interpretação genética dos perfis eletroforéticos obtidos nos géis foi feita tomando por base a estrutura quaternária das isoenzimas, conforme Ward *et al.* (1992). A nomenclatura utilizada segue o proposto por Murphy *et al.* (1996). Os dados foram analisados utilizando o programa POPGENE 1.32 (Yeh & Boyle, 1997). A variabilidade genética foi estimada pelo índice de diversidade genética de Nei (1978) e as frequências alélicas testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste de χ^2 .

Tabela 2. Descrição dos sistemas isoenzimáticos, E.C.nº= número de comissão, E.Q.= Estrutura quaternária da enzima.

Enzima (Abreviação)	E.C. Nº	E.Q.
Aspartato aminotransaminase (AAT)	2.6.1.1	Dimérica
Álcool desidrogenase (ADH)	1.1.1.1	Dimérica
Esterase (EST)	3.1.1.1	Monomérica
Glicose desidrogenase (GDH)	1.1.1.118	Dimérica
Glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH)	1.1.1.8	Dimérica
Isocitrato desidrogenase (IDH)	1.1.1.42	Dimérica
L-Lactato desidrogenase (LDH)	1.1.1.27	Tetramérica
Malato desidrogenase (MDH)	1.1.1.37	Dimérica
Superóxido dismutase (SOD)	1.15.1.1	Dimérica
Sorbitol desidrogenase (SORB)	1.1.1.14	Tetramérica

RESULTADOS

Neste trabalho foram testados dez sistemas isoenzimáticos em 93 espécimes de *G. inaequilabiatus*, sendo duas populações da planície de inundação do alto rio Paraná e uma população do rio Paraguai. As frequências alélicas nas populações estão sumarizadas na Tabela 3 e as medidas de variabilidade genética na Tabela 4. As estatísticas “F” de Sewall Wright estão na Tabela 5.

Tabela 3. Frequências alélicas em *Gymnotus inaequilabiatus* da planície de inundação do alto rio Paraná e do rio Paraguai. Os valores em negrito indicam alelos exclusivos da população.

Locus	Alelo	Planície de inundação do alto rio Paraná	Rio Paraguai
<i>Aat-1</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000
<i>Aat-2</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000
<i>Adh-1</i>	<i>a</i>	0,7045	1,0000
	<i>b</i>	0,2727	-
	<i>c</i>	0,0227	-
<i>Est-1</i>	<i>a</i>	0,7540	-
	<i>b</i>	0,2460	1,0000
<i>Est-2</i>	<i>a</i>	0,7667	-
	<i>b</i>	0,2333	1,0000
<i>Gdh-1</i>	<i>a</i>	0,0159	-
	<i>b</i>	0,9683	1,0000
	<i>c</i>	0,0159	-
<i>G3pdh-1</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000
<i>Idh-1</i>	<i>a</i>	0,1020	1,0000
	<i>b</i>	0,8980	-
<i>Idh-2</i>	<i>a</i>	0,0385	0,0333
	<i>b</i>	0,9615	0,9667
<i>Ldh-A</i>	<i>a</i>	0,0345	0,2500
	<i>b</i>	0,9483	0,7143
	<i>c</i>	0,0172	0,0357
<i>Ldh-B</i>	<i>a</i>	0,0702	-
	<i>b</i>	0,9298	1,0000
<i>Mdh-A</i>	<i>a</i>	0,5714	0,0714
	<i>b</i>	0,4127	0,9286
	<i>c</i>	0,1590	-
<i>Mdh-B</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000
<i>Mdh-C</i>	<i>a</i>	0,3279	0,9167
	<i>b</i>	0,6721	0,0833
<i>Sod-1</i>	<i>a</i>	0,7179	1,0000
	<i>b</i>	0,2821	-
<i>Sod-2</i>	<i>a</i>	0,6491	1,0000
	<i>b</i>	0,3509	-
<i>Sorb-1</i>	<i>a</i>	0,6129	1,0000
	<i>b</i>	0,2419	-
	<i>c</i>	0,1129	-
	<i>d</i>	0,0323	-

Na maioria dos sistemas enzimáticos foi possível detectar mais de um *locus* exceto para, GDH, G3PDH e SORB que apresentaram apenas um. O sistema isoenzimático Malato desidrogenase (MDH) apresentou três *loci* sendo um deles (*Mdh-B*) monomórfico.

Foram detectados 35 e 22 alelos para as populações da planície de inundação do alto rio Paraná e rio Paraguai respectivamente, distribuídos em 17 *loci*. A maioria dos *loci* apresentaram mais de um alelo em pelo menos uma das populações, sendo que o *locus* que mais apresentou alelos foi *Sorb-1* (Tabela 3).

Foram detectados alguns alelos exclusivos da população da planície de inundação do alto rio Paraná: *Adh-1(b)*, *Adh-1(c)*, *Est-1(a)*, *Est-2(a)*, *Gdh-1(a)*, *Gdh-1(c)*, *Idh-1(b)*, *Ldh-B(a)*, *Mdh-A(c)*, *Sod-1(b)*, *Sod-2(b)*, *Sorb-1(b)*, *Sorb-1(c)*, e *Sorb-1(d)*, e nenhum dos *loci* polimórficos encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A população da planície de inundação do alto rio Paraná apresentou a maior variabilidade genética, tanto pela frequência de *loci* polimórficos (76,47%), quanto pelo número médio de alelos por *locus* ($2,12 \pm 0,86$) e heterozigidade esperada ($0,2415 \pm 0,2072$) (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativas de variabilidade genética em *Gymnotus inaequilabiatus* da Planície de inundação do alto rio Paraná e do rio Paraguai. (N= número de indivíduos analisados, DP= Desvio padrão, Na= Número médio de alelos obtidos por *loco*, Ne = número médio efetivo de alelos por *loco*; P = frequência de *locos* polimórficos; H_o = heterozigidade média observada; H_e = heterozigidade média esperada).

Parâmetro estimado	Planície de Inundação do alto rio Paraná	Rio Paraguai
N	63	30
Na ± DP	2,12±0,86	1,29±0,59
Ne ± DP	1,42±0,41	1,07±0,18
P	76,47%	23,53%
H_o ± DP	0,0105 ± 0,0276	0,002 ± 0,0081
H_e ± DP	0,2415 ± 0,2072	0,0465 ± 0,1113

Valores de heterozigidade observada (Tabela 4), F_{IS} e F_{IT} para todos os *loci* (Tabela 5) indicam um excesso de homozigotos, e os valores de F_{ST} indicam alta diferenciação das populações *G. inaequilabiatus*. O valor médio de F_{ST} indica que 37,55% da variabilidade total é devida à separação delas (efeito de Whalund). Os valores de χ^2 mostram que as duas populações diferem significativamente quanto às frequências alélicas em 11 dos 17 *loci* (Tabela 5). O valor de identidade genética de Nei (1972) foi $I = 0,7889$ e o de distância genética foi $D = 0,2246$.

Tabela 5. Estatísticas F de Sewall Wright em duas populações de *Gymnotus inaequilabiatus*. Os valores de χ^2 se referem ao teste de homogeneidade das frequências alélicas entre as populações. (G.L.= grau de liberdade, P= probabilidade do valor de χ^2 , N= número de indivíduos analisados). Os valores em negrito indicam os *locos* em que as frequências alélicas são significativamente diferentes.

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>Fis</i>	<i>Fit</i>	<i>Fst</i>	χ^2	<i>g. l.</i>	<i>P</i>
<i>Aat-1</i>	62	****	****	0,0000	0,0000	0	1,0000
<i>Aat-2</i>	92	****	****	0,0000	0,0000	0	1,0000
<i>Adh-1</i>	72	1,0000	1,0000	0,1591	20,1911	2	0,0000
<i>Est-1</i>	93	0,9572	0,9831	0,6051	92,4647	1	0,0000
<i>Est-2</i>	90	1,0000	1,0000	0,6216	94,0909	1	0,0000
<i>Gdh-1</i>	93	1,0000	1,0000	0,0120	1,9466	2	0,3778
<i>G3pd-1</i>	56	****	****	0,0000	0,0000	0	1,0000
<i>Idh-1</i>	75	1,0000	1,0000	0,8148	112,9690	1	0,0000
<i>Idh-2</i>	82	1,0000	1,0000	0,0002	0,0284	1	0,8662
<i>Ldh-1</i>	86	1,0000	1,0000	0,0881	19,6877	2	0,0000
<i>Ldh-2</i>	86	1,0000	1,0000	0,0364	4,2687	1	0,0388
<i>Mdh-1</i>	91	1,0000	1,0000	0,2889	42,1549	2	0,0000
<i>Mdh-2</i>	93	****	****	0,0000	0,0000	0	1,0000
<i>Mdh-3</i>	91	0,7781	0,8599	0,3687	55,8820	1	0,0000
<i>Sod-1</i>	69	1,0000	1,0000	0,1642	20,1326	1	0,0000
<i>Sod-2</i>	87	1,0000	1,0000	0,2128	27,3370	1	0,0000
<i>Sorb-1</i>	46	0,8831	0,9027	0,1675	15,7116	3	0,0013
Média	80	0,9551	0,9720	0,3755			

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que as populações de *G. inaequilabiatus* da planície de inundação do Alto Paraná e do rio Paraguai analisadas são geneticamente diferentes, embora morfologicamente indistinguíveis. A população da planície de inundação do Alto Paraná apresenta maior diversidade genética do que a do rio Paraguai.

Fazendo uma comparação entre os valores de heterozigosidade esperada da população de *G. inaequilabiatus* da planície de inundação do Alto Paraná (0,2415) e do rio Paraguai (0,0465), analisadas neste trabalho, com os valores descritos por Ward *et al.* (1994), para 59 espécies de peixes de água doce do mundo todo (0,046), e com os valores detectados por (Lassala & Renesto, 2007) para 9 espécies de peixes da planície de inundação do Alto Paraná (0 à 0,147), podemos considerar que o valor obtido no presente trabalho para a população de *G. inaequilabiatus* da planície de inundação do Alto Paraná é extremamente alto, enquanto que para a população de *G. inaequilabiatus* do rio Paraguai, o valor de heterozigosidade esperada é semelhante à média de peixes de água doce. Além disso, a população do rio Paraná apresentou 14 alelos que não foram detectados na população do rio Paraguai.

De acordo com Thorpe, 1982, e Thorpe e Solé-Cava (1994), o índice de identidade genética de Nei (1972) entre duas populações da mesma espécie varia entre 0,80 e 1,00 e entre duas espécies do mesmo gênero varia entre 0,10 e 0,85. Assim, se a identidade genética entre duas unidades taxonômicas é inferior a 0,80, seguramente são duas espécies distintas, e se for inferior a 0,10 devem ser consideradas como espécies pertencentes a gêneros diferentes. A identidade genética entre as duas populações analisadas foi estimada em 0,7889 ($D = 0,2246$), um pouco abaixo do valor mínimo (0,80) para populações da mesma espécie. Isto indica que estas duas populações estão se tornando duas espécies distintas, através do processo de especiação geográfica. Este processo estabelece que duas populações isoladas geograficamente podem acumular diferenças genéticas e se tornarem espécies distintas (Mayr, 1963).

A bacia do rio Paraná se separou da bacia do rio Paraguai no Plioceno médio, há mais de três milhões de anos atrás (Stevaux *et al.*, 2004). Durante este período, as populações foram divergindo até uma distância genética média de 0,2246, ou seja 22,46% de códons diferentes. Admitindo-se que esta divergência tenha se dado apenas por mutações neutras, e admitindo a hipótese de que as taxas de mutação foram constantes durante este período, como prevê a teoria neutralista da evolução molecular (Kimura, 1968), e que o tempo de divergência entre as duas populações é de três milhões de anos, teríamos uma taxa de mutação de 74×10^{-7} por ano na população da planície de inundação do Alto Paraná.

Foi observado um excesso de homozigotos nas duas populações. Este excesso pode ser explicado pelo fato de esta espécie não sendo migradora, os indivíduos tendem a permanecer no local de reprodução aumentando o coeficiente de endogamia entre eles, o que gera um excesso de homozigotos. Assim, a endogamia aumenta a probabilidade de fixação de alelos colaborando com o processo de mutação para tornar as duas populações diferentes geneticamente.

Quaisquer que tenham sido os mecanismos que levaram a população da planície de inundação do rio Paraná se tornar diferente da população do rio Paraguai, elas são espécies incipientes. Todavia, transportes de peixes do rio Paraguai para servirem de iscas por pescadores na planície de inundação do alto rio Paraná pode interromper este processo de divergência evolutiva. Se este processo de divergência não for interrompido, as duas populações provavelmente se tornarão duas espécies distintas.

Sugerimos que os programas de manejo de pesca nessas duas bacias hidrográficas impeçam o fluxo gênico entre as populações de *Gymnotus inaequilabiatus* para que possa conservar e aumentar a diversidade biológica entre delas.

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, P.B., G.A. WINANS, D.J. TELL, G.B. MILNER & M. UTTER. Manual for starch gel electrophoresis: a method for the detection of genetic variation. **NOAA Technical Report NMFS**, 61, p. 1-17, 1987.

ALBERT, J.S.. Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). **Miscellaneous Publications Museum Zoology**, University of Michigan, 190, p. 1–127, 2001.

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

CARVALHO, G. R.. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. **J. Fish Biol.** 43, p.53-73, 1993.

CATELLA, A. C.. **A pesca no Pantanal Sul: situação atual e perspectivas**. Corumbá, MS, BR: Embrapa Pantanal, 43p. 2003.

FERNANDES, F. M. C.; ALBERT, J. S.; DANIEL-SILVA, M. F. Z.; LOPES, C.; CRAMPTON, W. G. R.; ALMEIDA-TOLEDO, L F.. A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. **Zootaxa** 933: 1–14, 2005.

KIMURA, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature** 217: 624-626.

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

MAYR, E. *Animal Species and Evolution*. 1963. Harvard University Press

MORALES, M. D. P. **Heterozigosidade em populações naturais de peixes de diferentes ambientes baseada em dados de isoenzimas**. 2000. 48f. Exame Geral de Qualificação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2000.

MURPHY, R. W., SITES Jr., J. W., BUTH, D. G. & HAUFLE, C. H. Poteins: Isozyme electrophoresis. In HILLIS, D. M., MORITZ, C. & MABLE, B. K. (Eds.). **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Assoc., p.51-120, 1996.

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

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

PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. **Practical isozyme genetics**. Chichester: Ellis Horwood, 1988. 215p.

ROTTA, M. A.. **Aspectos Biológicos e Reprodutivos para a Criação da Tuvira (Gymnotus sp.) em Cativeiro - I**. Corumbá, MS, BR: Embrapa Pantanal, 30p., 2004.

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

STEVAUX, J. C., SOUZA-FILHO, E. E., MEDEANIC, S. & YAMSKIKH, G. The quaternary history of the Paraná River and its floodplain. In: THOMAZ, S. M., AGOSTINHO, A. A. and HAHN, N. S. (Eds.). **The Upper Paraná River and its Floodplain: Physical Aspects, Ecology and Conservation**. 31-53, 2004. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands,

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, p. 3-18, 1994.

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

WARD, R.D., D.O.F. SKIBINSKI & M. WOODWARD. Protein heterozygosity, protein structure and taxonomic differentiation. **Evol. Biol**, 26, p. 73-59, 1992.

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

YEH, FRANCIS C., YANG, R-C., BOYLE, TIMOTHY, B.J., YE, Z-H., and MAO, JUDY X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.