

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

ELOÍSA REVALDAVES

**Variabilidade genética de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) na
bacia do rio Paraná evidenciadas por marcadores moleculares**

Maringá
2001

ELOÍSA REVALDAVES

**Variabilidade genética de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) na
bacia do rio Paraná evidenciadas por marcadores moleculares**

Tese 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 Doutor em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Renesto

Maringá
2001

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

R449v Revaldaves, Eloísa, 1970-
Variabilidade genética e estrutura populacional de *Prochilodus lineatus*
(Characiformes, Prochilodontidae) na bacia do rio Paraná evidenciadas por marcadores
moleculares / Eloísa Revaldaves. -- Maringá, 2001.
41 f. : il.

Tese (doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--Universidade
Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2001.

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Renesto.

1. *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) "curimba" - Variabilidade
genética - Marcadores moleculares - Paraná, 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

ELOÍSA REVALDAVES

**Variabilidade genética de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) na
bacia do rio Paraná evidenciadas por marcadores moleculares**

Tese 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 Doutor em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Erasmo Renesto
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Leda Maria Koelblinger Sodr e
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dr. Cláudio de Oliveira
Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Prof.^a Dr.^a Isabel Cristina Martins dos Santos
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Alberto José Prioli
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 20 de abril de 2001.

Local de defesa: Anfiteatro Prof. "Keshiyu Nakatani", Nupélia, Bloco G-90, *campus* da
Universidade Estadual de Maringá

À minha família, pelo sentido que dá à
minha vida, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente:

Ao CNPq e CAPES pelas bolsas concedidas.

Ao professor Erasmo Renesto pela orientação, confiança, respeito e amizade desde 1991.

À professora Yoko Terada (*in memoriam*) pelo exemplo de dedicação aos amigos.

À Marcia Leonel (nossa Fadinha) e Cláudia pela dedicação ao trabalho e carinho.

À Marcia (PPG) pela preparação da documentação para obtenção da bolsa sanduíche.

A todos os professores dos Cursos de Ciências Biológicas e Ecologia de Ambientes Continentais que participaram de minha formação desde o ingresso na graduação.

Aos professores Angelo A. Agostinho e Kirk Winemiller por terem me colocado em contato com o professor John Gold.

Ao professor John Gold e Linda Richardson pela orientação do trabalho realizado em College Station.

Aos professores Alberto José Prioli, Sonia M. A. P. Prioli e Isabel C. M. dos Santos por permitiram o uso do laboratório para finalização do trabalho de RAPD.

Aos amigos de laboratório: Cláudio, Maria Dolores, Ana, Roxelle e aos demais com quem dividi menor tempo, mas que, com certeza, também são especiais.

À “Betsi” pela ajuda com as formatações das tabelas e amizade.

Ao Eduardo pelo carinho e paciência em anotar todos os “TGCA”s, enquanto eu lia e relia as seqüências.

Ao Jaime pela confecção do mapa.

Aos amigos Pascale, Chris, Tim, Elena, Charlene que tornaram minha rotina de laboratório em College Station mais divertida.

Aos professores Horácio F. Júlio Jr, Ana Luiza P. Castro, Ana Silvia Lapenta, Maria Cláudia C. Ruvolo, Maria de Fátima F. P. S. Machado e Sonia M. A. P. Prioli pelas correções e sugestões feitas às primeiras versões do manuscrito.

À Sandra e Claudete pela amizade desde o tempo das enzimas.

A todos os funcionários do DBC e Nupélia, *sem exceção*, pela dedicação ao trabalho que tornou o meu trabalho mais fácil.

Ao Edson, Samuel e a todos os participantes das campanhas de coleta do Nupélia (optei por não citar mais nomes para não cometer injustiças), Alberto S. Fennocchio, Roberto Reis, Clara Navarrette e funcionários da Hidrelétrica de Promissão e Itaipu pelas coletas de

amostras. Muitas delas não foram usadas neste trabalho, mas servirão para estudos posteriores.

Variabilidade genética de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) na bacia do rio Paraná evidenciadas por marcadores moleculares

RESUMO

A sobrepesca, a poluição e a construção de barragens tem impactado importantes espécies de peixes migradores na Bacia do Rio Paraná. *Prochilodus lineatus* é uma espécie economicamente importante e endêmica na Bacia Platina. Um decréscimo na quantidade desembarcada desta espécie tem sido observado assim como a necessidade de seu manejo e conservação. Este estudo teve como objetivo investigar a variabilidade genética desta espécie através das técnicas de RAPD e sequenciamento de DNA mitocondrial. Os indivíduos analisados foram coletados nos rios Paraná, Baía, Corumbá e Miranda. Um total de 1815 pares de bases de doze indivíduos foi sequenciado para sete fragmentos de genes mitocondriais codificadores de proteína. As estimativas de porcentagem de divergência na sequência de nucleotídeos variaram de 0,00 a 0,95 e nenhum padrão de distribuição geográfica dos haplótipos de DNA foi observado. O estudo com RAPD incluiu 86 fragmentos de 58 indivíduos e revelou um alto polimorfismo. O teste exato de Fisher para verificar se as divergências genéticas eram significativas foi aplicado para os dados totais e entre populações geograficamente mais próximas. Os resultados obtidos sugerem que *Prochilodus lineatus* não está subdividida, embora tenham sido detectadas divergências significativas nas frequências de alguns locos. Estas informações são úteis para o planejamento de programas de estocagem e manejo de *P. lineatus*.

Palavras-chave: RAPD. DNA mitocondrial. *Prochilodus lineatus*. Variabilidade genética.

Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Paraná River basin revealed by molecular markers

ABSTRACT

Overfishing, pollution and construction of dams have impacted migratory fishes of Paraná River basin. *Prochilodus lineatus* is an economically important endemic migratory species from Platina basin. Decrease in *P. lineatus* landings have been observed as the need of management and conservation. This study aimed to investigate the genetic variability of this species through Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and mtDNA sequencing techniques. The analyzed individuals were collected in the Paraná, Bahia, Corumbá and Miranda Rivers. A total of 1815 base pairs from 12 individuals were sequenced to seven PCR-Amplified fragments representing five protein-coding mitochondrial genes. Estimates of percent nucleotide sequence divergence ranged from 0.00 to 0.95 and any geographic pattern to mtDNA haplotype distribution was observed. The RAPD study included 86 markers and 58 individuals and revealed a high level of polymorphism. Fisher's exact test was computed to verify whether the genetic differences were significant for the total data and between geographically proximate population samples. The results suggest that *Prochilodus lineatus* is not genetically subdivided, although significant divergence in frequencies of some RAPD fragments was found. This information may have useful for stocking and management programs plannings of *P. lineatus*.

Keywords: RAPD. Mitochondrial DNA. *Prochilodus lineatus*. Genetic variability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	09
2	OBJETIVO GERAL	12
	REFERÊNCIAS	13
3	VARIAÇÃO NA SEQÜÊNCIA DO DNAm_t ENTRE POPULAÇÕES DE <i>Prochilodus lineatus</i> DA BACIA DO RIO PARANÁ, BRASIL	15
	RESUMO	15
	ABSTRACT	16
3.1	INTRODUÇÃO	17
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.2.1	Coleta	18
3.2.2	Processamento das amostras	19
3.2.3	Análise dos dados	20
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
	REFERÊNCIAS	24
4	ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>Prochilodus lineatus</i> NA BACIA DO RIO PARANÁ, BRASIL, ACESSADAS POR RAPD	26
	RESUMO	26
	ABSTRACT	27
4.1	INTRODUÇÃO	28
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.2.1	Coleta	29
4.2.2	Processamento das amostras	30
4.2.3	Análise dos dados	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO GERAL

O rio Paraná é formado pela confluência dos rios Grande e Paranaíba na região centro-sul do Brasil, destacando-se como o décimo maior rio em comprimento no mundo (4695 km), drenando a maior parte da região centro sul da América do Sul, incluindo áreas da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (BONETTO, 1986; GOMES, 1999). A bacia do rio Paraná destaca-se também pelo elevado número de reservatórios construídos para geração de energia elétrica, sendo que no alto rio Paraná e seus principais tributários (Grande, Paranaíba, TIETÊ e Paranapanema), trecho compreendido entre a confluência dos rios Paranaíba e Grande e a barragem de Itaipu, há cerca de 130 reservatórios com barragens com alturas superiores a 10 metros (GOMES, 1999). No canal principal do rio Paraná, estão localizadas as barragens das hidrelétricas de Ilha Solteira que começou a operar em 1966, Jupia que começou a operar em 1973, Porto Primavera que teve suas comportas fechadas em 1998, Itaipu que começou a operar em 1982 e Yaciretá que começou a operar em 1994. No rio Paranaíba, a hidrelétrica de São Simão iniciou sua operação em 1978. As barragens de Itaipu, Ilha Solteira e São Simão representam obstáculos intransponíveis para espécies migratórias por não apresentarem mecanismos de transporte como escada, elevador ou eclusa. As hidrelétricas de Porto Primavera e Jupia dispõem de eclusas e Yaciretá dispõe de elevador.

A sucessão de represas ao longo dos rios resulta no desaparecimento de ambientes lóticos e substituição de espécies migratórias de importância comercial por espécies menos dependentes do ciclo de seca e cheia (AGOSTINHO *et al.*, 1992). O desaparecimento de grandes espécies migratórias no alto rio Paraná foi associado com a interrupção da rota migratória, imposta pela construção das barragens, que leva ao isolamento dos ambientes de desenvolvimento inicial, desova e crescimento. Mesmo as barragens que possuem escadas podem ser consideradas obstáculos uma vez que não favorecem o fluxo descendente (AGOSTINHO *et al.*, 2002), podendo ainda retardar ou encurtar as migrações de algumas espécies alterando o ciclo reprodutivo, uma vez que a interrupção do ciclo normal de migração pode desencadear estresse levando à perdas energéticas que poderiam ser usadas para reprodução (WOOTON, 1990). Estudos realizados nas planícies de inundação dos rios Paraná (VAZZOLER *et al.*, 1997) e do Paraguai (RESENDE *et al.*, 1996) demonstraram que a preservação da heterogeneidade dos habitats das planícies de inundação é vital para a manutenção da diversidade biológica das espécies, sendo que o controle do fluxo, principalmente em períodos de secas prolongadas, pode afetar o recrutamento de espécies que

utilizam a planície de inundação como área de refúgio e alimentação como *Prochilodus lineatus*.

O curimba, *P. lineatus*, é um caraciforme iliófago, endêmico da bacia Platina que apresenta alta capacidade migratória e estratificação quanto a distribuição de classes de comprimento e grau de maturação, ou seja, os jovens permanecem nas lagoas da planície de inundação até atingirem a idade adulta, por volta dos 2 anos, quando se juntam aos cardumes migrantes no período de reprodução que compreende os meses de setembro a março (TOLEDO-FILHO, 1983; GOMES; AGOSTINHO, 1997; SVERLIJ *et al.*, 1993). Quando as migrações não são capazes de compensar a perda da diversidade genética e recursos genéticos adaptados localmente a produção pesqueira pode diminuir (CARVALHO; HAUSER, 1995). A diminuição nos desembarques de *P. lineatus* observada na última década (AGOSTINHO *et al.*, 1999) tem despertado o interesse por um monitoramento mais efetivo, incluindo o conhecimento da estrutura genética da espécie visando a uma adequação dos processos de estocagem e a manutenção da variabilidade genética.

As técnicas de transferência de estoque e introdução de espécies têm sido usadas para restauração, manutenção e criação de novas pescarias, visando evitar a erosão do *pool* genético e a extinção de espécies. Para o sucesso dos programas de estocagem, os estoques fundadores devem ser formados a partir de estoques selvagens da mesma bacia, uma vez que apresentam baixos níveis de endocruzamento e alto potencial biológico para se adaptar as condições dos reservatórios (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1992). Estudos comparativos entre espécies naturais e cultivadas têm demonstrado que espécies com altos valores de heterozigosidade apresentam valores altos de variância genética adicional nas características quantitativas como taxa de crescimento, sucesso reprodutivo ou resistência a doenças (ALLENDORF; RYMAN, 1987; LEBERG, 1990; SKAALA *et al.*, 1990; HINDAR *et al.*, 1991; REINA *et al.*, 1994; FERGUSON, 1996). As Centrais Elétricas de São Paulo (CESP), durante o período de 1979 a 1995, estocou 129.567 bilhões de peixes representantes de 22 espécies, incluindo 52584 milhões de curimbas, nos reservatórios dos rios Tietê, Grande, Paraná e Paranapanema (CESP, 1996). Porém, estas estocagens foram realizadas sem o conhecimento prévio da variabilidade genética e estrutura populacional das espécies, assim como sem avaliação posterior da efetividade.

O objetivo comum do manejo da pesca é garantir a sustentabilidade do recurso e ao mesmo tempo maximizar o retorno econômico para a comunidade. Para alcançar este objetivo, um vasto conjunto de informações científicas, econômicas e sociais, incluindo

informações sobre a estrutura populacional deve ser considerado (CARVALHO; HAUSER, 1995). Allendorf e Utter (1979) e Allendorf *et al.*, (1987) alertaram que o manejo da pesca requer conhecimento da estrutura populacional, incluindo a possibilidade da existência de populações geneticamente diferentes, a qual pode ser acessada por eletroforese de enzimas e DNA. Estas técnicas incluem análise de fragmentos de restrição e/ou seqüenciamento direto do DNA mitocondrial, assim como uso do PCR para amplificação de seqüências nucleares mais variáveis como minisatélites, microsátélites e RAPD. Uma boa descrição destes métodos pode ser observada nos livros editados por Avise, 1994 e Hillis *et al.*, 1996.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo é quantificar a variabilidade genética das populações de *P. lineatus* coletadas na bacia do rio Paraná através das técnicas de RAPD e seqüenciamento direto de fragmentos do DNA mitocondrial. Comparando a variabilidade de *P. lineatus* nos diferentes ambientes amostrados, pretendemos avaliar a existência ou não de estruturação populacional com o intuito de detectar os possíveis efeitos das barragens sobre a estrutura genética desta espécie, assim como estabelecer pontos de coleta para estoques fundadores em projetos de piscicultura que visem a estocagem.

REFERÊNCIAS

- Agostinho, A.A., Júlio Jr, H.F., Borghetti, J.R.** (1992). Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipú. *Revista UNIMAR 14*: 89-107.
- Agostinho, A.A., Miranda, L.E., Bini, L.M., Gomes, L.C., Thomaz, S. M., Suzuki, H.I.** (1999). Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: *Theoretical reservoir ecology and its applications* (Tundisi, J.G., Straskraba, M., eds.). International Institute of Ecology. Brazilian Academy of Sciences and Backhuys Publishers. pp. 227-265.
- Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Fernandez, D.R.** (2002). Fish ladder for management of the neotropical fish fauna. *River research and Applications 18*: 299-306.
- Allendorf, F.W., Utter, F.M.** (1979). Population genetics. In: *Fish Physiology* (Hoar, W.S., Randal, D.J, Brett, J.R., eds.). Academic Press, New York. pp. 407-454.
- Allendorf, F.W., Ryman, N.** (1987). Genetic management of hatchery stocks. In: *Population Genetics e Fishery Management* (Ryman, N., Utter, F., eds.). University of Washington Press, Washington. pp. 141-159.
- Allendorf, F.W., Ryman, N., Utter, F.M.** (1987). Genetics and fishery management. Past, present and future. In: *Population Genetics e Fishery Management* (Ryman, N., Utter, F., eds.). University of Washington Press, Washington. pp. 1-19.
- Awise J. C.** (1994). *Molecular Markers , Natural History, and Evolution*. Chapman and Hall, New York. 511p.
- Bonetto, A.A.** (1986). Fish of the Paraná system. In: *The Ecology of River Systems* (Davies, B.R., Walker, K.F., eds.). Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 573-588.
- Carvalho, G.R., Hauser, L.** (1995). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. In: *Molecular genetics in fisheries*. (Carvalho, G.R., Pitcher, T.J., eds). TJ Press (Padstow) Ltd.: Padstow, Cornwall. pp. 55-79.
- CESP.** (1996). Aspectos limnológicos, ictiológicos e pesqueiros de reservatórios da CESP no período de 1986 a 1994/CESP - Série Pesquisa e Desenvolvimento, 136p.
- Ferguson, M.M.** (1996). Variation at enzyme coding and correlates of fitness in rainbow trout: a cohort analysis. *Journal of Fish Biology 48*: 1088-1096.
- Gomes, L.C., Agostinho, A.A.** (1997). Influence of the flooding regime on the nutritional state and juvenile recruitment of the curimba, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, in the upper Paraná River, Brazil. *Fisheries Management and Ecology 4* (4): 263-274.
- Gomes L. C.** (1999). Factors affecting fishery yield from reservoirs of the upper Paraná River basin, Brazil. Tese de Doutorado. Mississippi State University, Mississippi. 81p.

- Hillis, M., Moritz, C., Mable, B.K.** (1996). *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets. 655p.
- Hindar, K., Ryman, N., Utter, F.** (1991). Genetics effects of cultured fish on natural fish populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48: 945-957.
- Leberg, P.L.** (1990). Influence of genetic variability on population growth: implications for conservation. *Journal of Fish Biology* 37: 193-195.
- Reina, J.; Martinez, G.; Amores, A., Alvarez, M.C.** (1994). Interspecific genetic differentiation in western Mediterranean sparid fish. *Aquaculture* 125: 47-57.
- Resende, E.K., Catella, A.C., Nascimento, L.L., Palmeira, S.S., Pereira, R.A.C., Lima, M.S., Almeida, V.L.L.** (1996). Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na Bacia Hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil. Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP. (EMBRAPA-CPAP.Boletim de Pesquisa, 02). 75p.
- Skaala, Ö., Dahle, G., Jörstad, K.E., Nævdal, G.** (1990). Interactions between natural and farmed fish populations: information from genetic markers. *Journal of Fish Biology* 36: 449-460.
- Sverlij, S.B., Ross, A.E, Orti, G.** (1993). *Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del sabalo Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1847)*. FAO Sinopsis sobre la Pesca, No. 154. Roma, FAO. 64p.
- Toledo-Filho, S.A.** (1983). Distribuição espacial do curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, do rio Mogi-Guaçu. *Ciência e Cultura* 35: 1112-1114.
- Toledo-Filho, S.A., Almeida-Toledo, L.F, Foresti, F., Galhardo, E., Donola, E.** (1992). Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento e reservatórios. In: *Cadernos de Ictiogenética*.USP, São Paulo. p. 37.
- Vazoller, A.E.M., Agostinho, A.A., Hahn, N.S.** (1997). *A planície de inundação do alto rio Paraná. Aspectos físicos, biológicos e sociológicos*. EDUEM, Maringá. 317 p.
- Wootton, R.J.** (1990). *Ecology of teleost fishes: fish and fisheries*. Series 1. Chapman & Hall: New York. 404 p.

3 VARIACÃO NA SEQUÊNCIA DO DNAm ENTRE POPULAÇÕES DE *Prochilodus lineatus* DA BACIA DO RIO PARANÁ, BRASIL

RESUMO

A técnica de seqüenciamento gênico do DNA mitocondrial foi usada para investigar a estrutura genética de *Prochilodus lineatus*, representada por quatro populações coletadas nos rios Miranda, Paraná, Baía e Corumbá. Um total de 1815 pares de bases de doze indivíduos foi seqüenciado a partir de sete fragmentos amplificados por pcr representando cinco genes mitocondriais codificadores de proteína (ND2, COI, ND4, ND4L E CYT B). onze haplótipos de DNA mitocondrial foram observados entre os doze indivíduos. As estimativas de porcentagem de divergência na seqüência de nucleotídeos variaram de 0 a 0,95. As similaridades genéticas e a falta de um padrão de distribuição geográfica dos haplótipos do DNA mitocondrial permitem inferir que a restrição do movimento de migração devido à construção das barragens não alterou substancialmente a composição do DNA mitocondrial de *P. lineatus*.

ABSTRACT

DNA sequencing technique was used to investigate the genetic structure on *Prochilodus lineatus*. We studied four populations from the Miranda, Paraná, Baía, and Corumbá Rivers. A total of 1815 base pairs from 12 individuals were sequenced from seven PCR-Amplified fragments representing five protein-coding mitochondrial genes (ND2, COI, ND4, ND4L e CYT B). A total of eleven mtDNA haplotypes were observed among the twelve individuals. Estimates of percent nucleotide sequence divergence ranged from 0,00 to 0.95. The genetic similarities and the absence of geographic pattern to mtDNA haplotype distribution permit the inference that the restriction of migratory movement due to construction of the dams has not altered substantially the mtDNA composition of *P. lineatus*.

3.1 INTRODUÇÃO

O curimba ou curimbatá, *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) é uma espécie de alta capacidade migratória, endêmica da bacia Platina que se destaca economicamente nos rios Paraná e Paraguai (AGOSTINHO *et al.*, 1994; RESENDE *et al.*, 1996). Os desembarques pesqueiros de *P. lineatus* na bacia do rio Paraná têm diminuído significativamente na última década (AGOSTINHO *et al.*, 1999); enquanto os desembarques no rio Paraguai têm permanecido constantes (CATELLA; ALBUQUERQUE, 2000). Além da presença do Salto de Sete Quedas que constituía uma barreira geográfica natural no rio Paraná antes da construção da barragem da hidrelétrica de Itaipu, a principal diferença entre os dois rios reside na presença de numerosas usinas hidrelétricas no rio Paraná e ausência das mesmas no rio Paraguai.

No Brasil várias espécies, entre elas *P. lineatus*, têm sido introduzidas e estocadas em reservatórios com o objetivo de minimizar o decréscimo dos desembarques pesqueiros, porém sem o conhecimento prévio da estrutura genética das populações e sem considerações sobre avaliação e monitoramento genético. Durante o período de 1979 a 1995, mais de 50 milhões de *P. lineatus* jovens foram estocados em reservatórios da Bacia do rio Paraná (CESP, 1996). O manejo pesqueiro deveria incluir estratégias para minimizar os efeitos negativos das interações genéticas entre peixes cultivados e selvagens (FERGUSON, 1994), assim como deveria ser conhecida a estrutura populacional da população selvagem (ALLENDORF; UTTER, 1979; ALLENDORF; RYMAN, 1987).

Várias técnicas de genética molecular estão disponíveis para estudos populacionais de alta resolução (PARKER *et al.*, 1998). Estas técnicas incluem análise de fragmentos de restrição e/ou seqüenciamento direto do DNA mitocondrial, assim como uso do PCR para amplificação de seqüências nucleares mais variáveis como minissatélites, microsatélites e RAPD (AVISE, 1994; WRIGHT; BENTZEN, 1994). Até recentemente, a técnica de alta resolução mais empregada era a análise de DNA mitocondrial (AVISE, 1994). O DNA mitocondrial apresenta características atrativas para estudos populacionais como haploidia, herança materna, ausência de seqüências não codificadoras, com exceção da região *D-loop*.

Neste estudo, empregamos a técnica de seqüenciamento direto do DNA mitocondrial para avaliar a distribuição dos genótipos mitocondriais (haplótipos) dos indivíduos de *P. lineatus* coletados nos rios Paraná, Baía, Corumbá e Miranda (afluente do rio Paraguai).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta

Exemplares adultos de *P. lineatus* foram coletados nas seguintes localidades: **Rio Baía** (BA) – este ponto de coleta não pode ser observado no mapa devido à escala utilizada, portanto foi indicado pelo símbolo “•”, **Rio Paraná**, a jusante da barragem de Itaipu (JI), **Rio Corumbá** (CO)-, afluente do Rio Paranaíba, e **Rio Miranda** (MI)-, afluente do Rio Paraguai. As localidades podem ser visualizadas na Figura 1. As amostras de tecido muscular foram retiradas logo após a captura e armazenadas em etanol 95%.

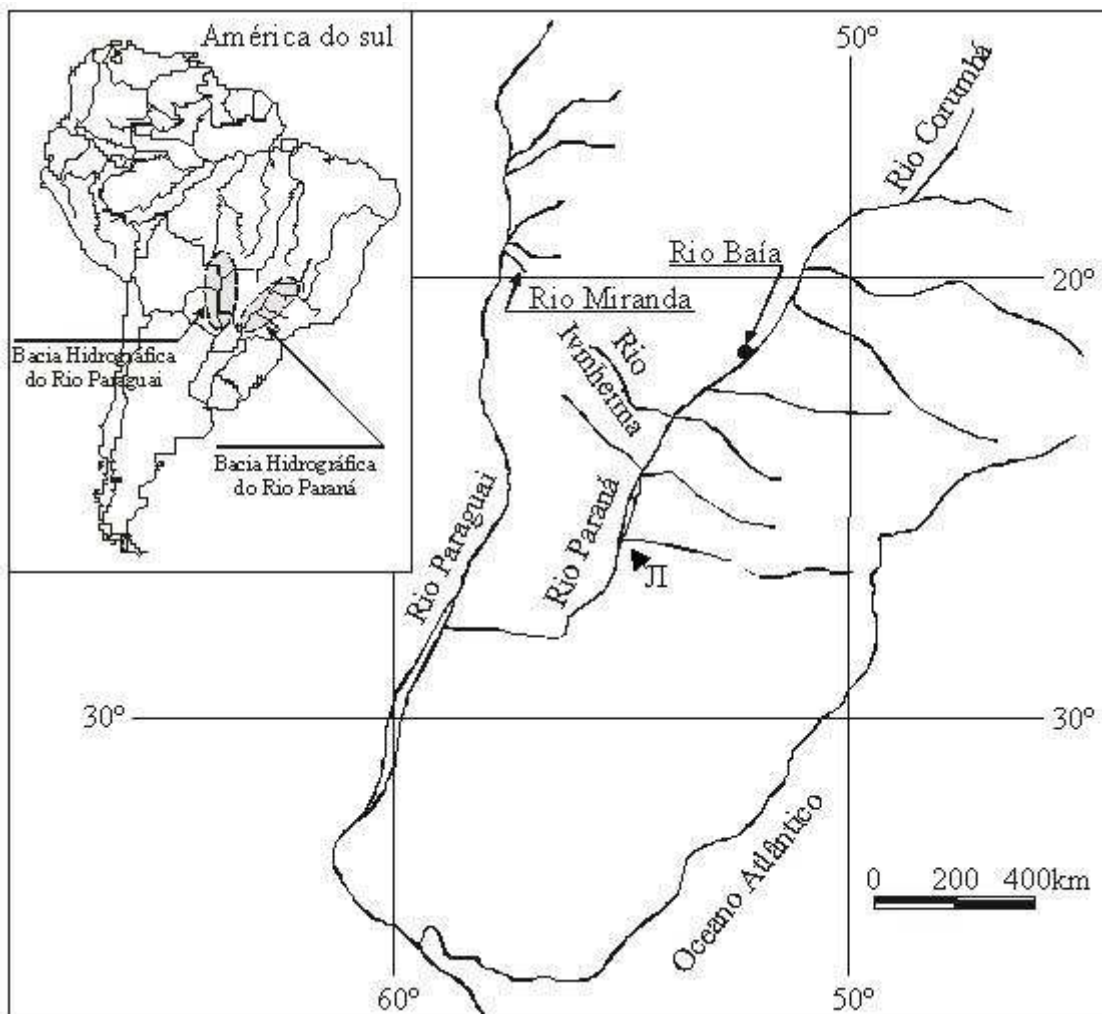


Figura 1 - Local de coleta das amostras de *Prochilodus lineatus* na bacia do rio Paraná. JI corresponde ao ponto de coleta à jusante da hidrelétrica de Itaipu

3.2.2 Processamento das amostras

Foram analisados 4 indivíduos do Rio Miranda (MI-1, MI-2, MI-4 E MI-5), 2 indivíduos da região a jusante da barragem de Itaipu (JI-1 E JI-2), 2 indivíduos do Rio Baía (BA-1 E BA-2) e 4 indivíduos do Rio Corumbá (CO-1, CO-2, CO-3 E CO-4).

O DNA genômico foi isolado como descrito em Gold e Richardson (1991), com algumas modificações. Aproximadamente 120 mg do tecido preservado no etanol 95% foram colocados em 400 µl de tampão TE (0,1 M NaCl, 50mM TRIS, 1mM EDTA; pH 7,5). As células foram rompidas pela adição de 8 µl de proteinase K (solução 10 mg/ml) e 20 µl de SDS 20% (*Sodium Dodecyl Sulfato*) diluído em água. As amostras foram incubadas por 24 horas a temperatura de 37^o C. A mistura foi agitada vigorosamente e, em seguida, submetida a duas extrações com igual volume da solução de Fenól:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) e centrifugadas por 4 minutos a 14000 rpm durante cada extração para facilitar a separação das fases. O sobrenadante foi extraído duas vezes com solução de Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:10) e centrifugados como descrito anteriormente. O DNA foi precipitado pela adição da solução de NaCl 2M (1:10) e de etanol absoluto gelado (2:1). As amostras foram submetidas a temperatura de -20^o C por, aproximadamente, 16 horas. O DNA foi recuperado através de centrifugação a 8000 rpm por 10 minutos a 4^o C e, em seguida, dissolvido em água.

Nas reações de amplificação foram utilizados os seguintes *primers* (Tabela 1): ND2B-L e ND2E-H Para o gene NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2) (Broughton e Gold, 2000); COI LB e COI HB para o gene Citocromo Oxidase I (COI) (PALUMBI, 1994); ARGB-L e NAP2 (BIELAWSKI; GOLD, 1996) para o Gene NADH DESIDROGENASE subunidade 4 (ND4), e para o Gene NADH DESIDROGENASE subunidade 4L (ND4-L); e CYT LA, CYT HA, CYT LB e CYT HB (Schmidt *et al.*, 1998) para o Gene Citocromo B (CYT B). As sequências foram depositadas no GENBANK sob os números de acesso: AY115366.1-AY11537.1 AND AY115354-AY115365.1 (ND-2); AY115307.1-AY115318.1 (ND-4); AY115378.1-AY115389.1 (ND-4L); AY115319.1-AY115330.1 (COI); AY115343.1-AY115353.1 AND AY115335.1-AY115342.1 (CYT B).

As reações de amplificação foram feitas em um volume de 50 µl contendo 1 X *Taq* buffer, 200mM dNTP, 2mM MgCl₂, 0,5 µM de cada primer, aproximadamente 100 ng de DNA e 0,25 unidades de *Taq*. As etapas de amplificação compreenderam 25 ciclos de desnaturação (60 sec, 95^o C), anelamento (90 sec, 47^o C) e extensão (120 sec, 72^o C). Os

excessos de *primers*, nucleotídeos e polimerases foram removidos utilizando-se os produtos do *kit* Prep-A-Gene® DNA (BioRad). Os produtos de amplificação foram seqüenciados utilizando-se o *kit* “Promega *fmol* DNA sequencing system”, utilizando-se *primers* marcados radioativamente com ^{32}P . O programa de seqüenciamento consistiu de um ciclo de 95° C (120 sec), 65° C (30 sec), e 72° C (30 sec), seguido por 30 ciclos de 95° C (60 sec), 65° C (30 sec) e 72° C (30 sec). Os produtos foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 6% e posteriormente autoradiografados.

3.2.3 Análise dos dados

As seqüências de DNA foram lidas manualmente, alinhadas utilizando-se o programa Gene Tool 1.0 (Bio Tools Inc.) e, posteriormente, submetidas à pesquisa no site www.ncbi.nlm.nih.gov para confirmar a amplificação do gene esperado com comparação com a seqüência de *Cyprinus carpio* (CHANG *et al.*, 1994).

Estimativas da divergência encontrada entre indivíduos foram computadas utilizando-se o modelo dos dois parâmetros de Kimura (1980)- *Kimura 2- parameter*. A matriz de distância resultante foi utilizada para construir um dendrograma baseado na análise de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining tree*), utilizando-se o programa MEGA (KUMAR *et al.* 1993). A robustez (reprodutibilidade) dos da árvore gerada foi acessada via *bootstrapping* com 500 replicações (FELSENSTEIN, 1985). A análise de máxima parcimônia das seqüências de DNA mitocondrial foi realizada com programa PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) de Swofford (1991).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 1815 pares de base do DNA mitocondrial foi seqüenciado, incluindo as seqüências parciais dos genes ND2, COI, ND4, ND4-L e Cyt *b*. Os genes parcialmente seqüenciados, os *primers* e suas seqüências e o total de pares de bases obtidos estão listados na Tabela 1. Foram seqüenciados dois fragmentos de DNA para o gene ND2 totalizando 542 pares de bases. Os fragmentos de DNA gerados pelos *primers* COI HB, NAP2 e Cyt HA incluem 11 pares de bases do tRNA^{ser}, 12 pares de bases do tRNA^{arg} e 14 pares de bases do tRNA^{trp}, respectivamente.

Não foi possível incluir na análise a seqüência obtida para o indivíduo BA-1 com o *primer* Cyt HA, pois as bandas ficaram muito fracas não permitindo uma leitura confiável.

Tabela 1 - Genes, primers, seqüências de bases dos primers e total de pares de bases seqüenciados de DNA mitocondrial para *Prochilodus lineatus* da bacia do rio Paraná

Genes	Primers	Seqüência dos primers	Número p.b
ND2	ND2B-L*	5'-aagcttccggccataccc-3'	277
	ND2E-H*	5'-ttctactaaagcttgaaggc-3'	265
COI	COI LB	5'-gcattcccacgaataaata-3'	293
	COI HB*	5'-agttatgtgctggctgaaa-3'	
ND4-L	ArgB-L*	5'-caagacccttgatttcggctca-3'	302
	Nap2	5'-tggagcttctacgtggctt-3'	
ND4	ArgB-L	5'-caagacccttgatttcggctca-3'	288
	Nap2*	5'-tggagcttctacgtggctt-3'	
Cyt b	Cyt LC*	5'-atacatgccaacggagc-3'	110
	Cyt HB	5'-agttatgtgctggctgaaa-3'	
Cyt b	Cyt LA	5'-gtgacttgaaaaccaccgtg-3'	280
	Cyt HA*	5'-caacgatctccggtttacaagac-3'	
Total			1815

* Indica o primer utilizado na reação de seqüenciamento

As seqüências formadas pelas bases variáveis dos doze indivíduos analisados estão apresentadas na Tabela 2. Trinta e uma posições variáveis foram identificadas: ND2 (oito posições variáveis), COI (uma posição variável), ND4/ND4L (16 posições variáveis) e CYT B (seis posições variáveis). Todas as diferenças nas seqüências dos indivíduos foram transições, nenhuma inserção ou deleção foi observada.

Onze genótipos do DNA mitocondrial (Haplótipos) foram observados entre os doze indivíduos, um indivíduo do rio Paraná (JI-1) e um do Rio Corumbá (CO-4) apresentaram seqüências idênticas (Tabela 2).

Tabela 2 - Trinta e uma posições variáveis do DNA mitocondrial dos doze indivíduos de *Prochilodus lineatus* analisados. Os nucleotídeos de cada posição variável é dado para o indivíduo BA-1. Para os demais indivíduos, somente os nucleotídeos que diferem do indivíduo BA-1 serão mostrados. As seqüências do DNA mitocondrial dos indivíduos JI-1 e CO-4 são idênticos. O sinal “?” indica que a seqüência não foi analisada

IND.	G E N E S															
	ND2								COI	ND4/ND4L						
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	1	2	3	4	5	6	7
BA-1	A	C	A	C	T	T	A	C	A	A	G	G	T	T	A	C
BA-2	C	.	.
JI-1	.	T	C	G	.
JI-2	G	G	.	.	.	C	.	.
CO-1	C	.	.
CO-2	G	.	.	.	C	.	G	C	.	.
CO-3	G
CO-4	.	T	C	G	.
MI-1	.	.	G	A	.	C	.	.
MI-2	.	.	.	T	.	C	.	T	T
MI-3	C	.	G	C	.	.
MI-4	.	T	.	.	.	C	A	.	C	.	.	T

A ausência de um padrão coeso de divisão geográfica dos haplótipos do DNA mitocondrial também foi revelado pela análise de agrupamento de vizinhos (*NEIGHBOR-JOINING*) da matriz de divergência de seqüência (Figura 2) e análise de parcimônia. Pela análise de parcimônia foram geradas sete árvores mais parcimoniosas, cada uma com 23 passos e um valor de IC (Índice de Consistência) de 0,826. A árvore gerada (*50% MAJORITY-RULE CONSENSUS TREE*) revelou uma grande politomia (Figura não apresentada no trabalho). Os clados identificados na análise de máxima-parcimônia MI-2 com MI-4; CO-3 com BA-1; CO-2 com MI-3; e JI-1 com CO-4 foram os mesmos que foram apoiados por um valor de *bootstrap* de pelo menos 75% na análise de agrupamento de vizinhos (Figura 2).

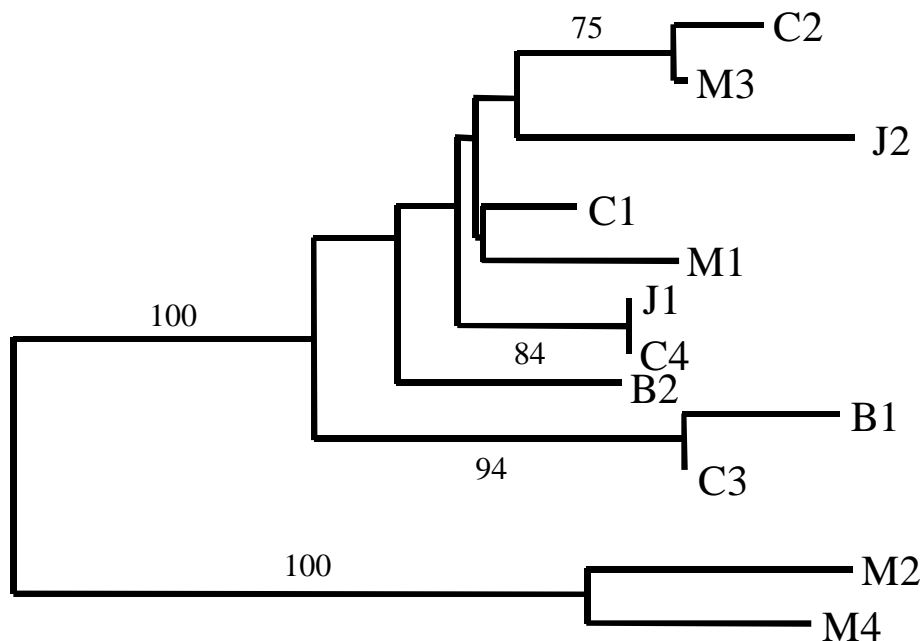


Figura 2 - Dendrograma gerado pela análise de agrupamento de vizinhos utilizando a matriz de divergência obtida pelo modelo dos 2 parâmetros de Kimura (1980) para os genes genes ND2, COI, ND4, ND4L e Cyt *b* de *Prochilodus lineatus* da bacia do rio Paraná.. Os valores indicados correspondem aos resultados da análise *bootstrap*

As similaridades genéticas nos haplótipos de DNA mitocondrial, assim como a ausência de um padrão geográfico na distribuição destes haplótipos permitem sugerir a existência de um considerável fluxo gênico ou pelo menos a existência deste em um passado recente entre *P. Lineatus* dos trechos superiores do rio Paraná e Paraguai. A alta capacidade migratória desta espécie e expressivo tamanho populacional parece manter a diversidade da espécie neste amplo espaço amostrado. Resultados similares foram verificados por Sivasundar *et al.* (2001) em seu estudo sobre variação geográfica em três genes mitocondriais (D-LOOP, ATPASE 6 e ATPASE 8) entre amostras de *P. Lineatus* do rio Paraná e por Revaldaves *et al.*

(1997) em seu estudo de divergência alozimática entre três populações de *P. lineatus* no alto rio Paraná. Em conjunto, estes dados sugerem que a restrição do movimento devido à construção das barragens não alterou substancialmente a composição do DNA mitocondrial da espécie.

REFERÊNCIAS

- Agostinho, A.A., Miranda, L.E., Bini, L.M., Gomes, L.C., Thomaz, S. M., Suzuki, H.I.** (1999). Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: *Theoretical reservoir ecology and its applications* (Tundisi, J.G., Straskraba, M. eds.). International Institute of Ecology. Brazilian Academy of Sciences and Backhuys Publishers. pp. 227-265.
- Agostinho, A.A., Júlio Jr., H.F., Petrere Jr., M.** (1994). Itaipu reservoir (Brazil): Impacts of impoundment on the fish and fisheries. In: *Rehabilitation of Freshwater Fisheries* (Cowxi, G., ed.). Fishing News Book, Bodmin, UK, pp. 177-184.
- Allendorf, F.W. e Ryman, N.** (1987). Genetic management of hatchery stocks. In: *Population Genetics & Fishery Management* (Ryman, N., Utter, F., eds.). University of Washington Press, Washington, pp. 141-159.
- Allendorf, F.W. e Utter, F.M.** (1979). Population genetics. In: *Fish Physiology* (Hoar, W.S., Randal, D.J., Brett, J.R., eds.). Academic Press, New York, pp. 407-454.
- Avise J. C.** (1994). *Molecular Markers , Natural History, and Evolution*. Chapman and Hall, New York. 511p.
- Bielawski, J.P., Gold, J.R.** (1996). Unequal synonymous substitution rates within and between two protein-coding mitochondrial genes. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 889-892.
- Broughton, R.E., Gold, J.R.** (2000). Phylogenetic relationships in the North American cyprinid genus *Cyprinella* (Actinopterygii: Cyprinidae) based on sequences of the mitochondrial ND2 and ND4L genes. *Copeia 2000*: 1-10.
- Catella, A.C., Albuquerque, F.F.** (2000) Sistema de controle da pesca do Mato Grosso do Sul. SCPESCA/MS-3, 1996. Corumbá: Embrapa Pantanal/SEMA-FEMAP, (Embrapa Pantanal.Boletim de Pesquisa N^o15). 48p.
- CESP.** (1996). Aspectos limnológicos, ictiológicos e pesqueiros de reservatórios da CESP no período de 1986 a 1994/CESP - Série Pesquisa e Desenvolvimento, 136p.
- Chang, Y.S., Huang,F.L., LO, T.B.** (1994). The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *Journal of Molecular Ecology* 38 (2): 138-155.

- Felsenstein, J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Ferguson, M.** (1994). The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*: 4: 351-73.
- Gold, J.R., Richardson, L.R.** (1991). Genetics studies in marine fishes. IV. An analysis of population structure in red drum (*Sciaenops ocellatus*) using mitochondrial DNA. *Fisheries Research* 12: 213-241.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.** (1993). MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, version 1.02. Inst. Mol. Evol. Gen., Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Palumbi** (1994). Genotypic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 547-572.
- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, A.A., Booton, G.C., Fuerst, P.A.** (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.
- Resende, E.K., Catella, A.C., Nascimento, L.L., Palmeira, S.S., Pereira, R.A. C., Lima, M.S., Almeida, V.L.L.** (1996). Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na Bacia Hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil. Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP, 1996. 75p. (EMBRAPA-CPAP. Boletim de Pesquisa, 02).
- Revaldaves, E., Renesto, E., Machado, M. F. P. S.** (1997). Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Parana River. *Brazilian Journal of Genetics* 20: 381-388.
- Sivasundar, A, Bermingham, E., Ortí, G.** (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407-417.
- Swofford, D.L.** (1991). PAUP: phylogenetic analysis using parsimony. Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
- Schmidt, T.R., Bielawski, J.P., Gold, J.R.** (1998). Molecular phylogenetics and evolution of the cytochrome *b* gene in the cyprinid genus *Lythrurus* (Actinopterygii: Cypriniformes). *Copeia* 1998: 14-22.
- Wright, J.M, Bentzen, P.** (1994). Microsatellites: genetic markers for the future. *Ver. Fish. Biol. Fish.* 4: 384-388.

4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Prochilodus lineatus* DA BACIA DO RIO PARANÁ, BRASIL, ACESSADAS POR RAPD

RESUMO

A técnica de RAPD foi usada para investigar a variabilidade genética e estrutura genética de *Prochilodus lineatus*, representada por cinco populações coletadas na bacia do rio Paraná. Este estudo incluiu sete *primers* que amplificaram 86 locos. O teste exato de Fisher foi aplicado para os dados totais e entre populações geograficamente mais próximas. Os resultados sugerem que *Prochilodus lineatus* não está subdividida, embora tenha sido detectada divergência nas frequências de alguns locos entre as populações amostradas. Este estudo fornece informações úteis para o planejamento de programas de estocagem e manejo de *P. lineatus*.

ABSTRACT

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was used to investigate the genetic variability and genetic structure on *Prochilodus lineatus*. We studied five populations from the Paraná River Basin. The RAPD study included 86 markers and 58 individuals. The Fisher's exact test was computed for the total data and between geographically proximate populations samples. The results suggest that *Prochilodus lineatus* is not genetically subdivided, although significant divergence in frequencies of some rapd fragments was found. This study may have useful information for stocking and management programs plannings of *P. lineatus*.

4.1 INTRODUÇÃO

No alto rio Paraná e em seus principais tributários (rios Grande, Paranaíba, Tietê e Paranapanema) há 130 barragens com alturas superiores a 10 metros, sendo que quatro delas, Ilha Solteira, Jupia, Porto Primavera e Itaipu, estão localizadas no canal principal do rio Paraná (GOMES, 1999). Abaixo de Itaipu, no médio rio Paraná, localiza-se a barragem da hidrelétrica de Yaciretá. A construção de reservatórios para geração de energia elétrica pode modificar o padrão de distribuição de várias espécies migradoras seja pela eliminação de barreiras geográficas naturais como o Saltos de Sete Quedas que foi inundado com a construção da hidrelétrica de Itaipu (AGOSTINHO *et al.*, 1992) ou pela imposição de uma barreira artificial que pode levar à extinção de espécies menos aptas ou à perdas na variabilidade genética (GODINHO; GODINHO, 1994). A produção pesqueira pode diminuir caso as migrações não sejam capazes de compensar a perda da diversidade genética e recursos genéticos adaptados localmente (CARVALHO; HAUSER, 1995).

Diante do decréscimo dos desembarques pesqueiros de espécies migradoras como *Prochilodus lineatus* no rio Paraná na última década (AGOSTINHO *et al.*, 1999), a preocupação com o conhecimento da estrutura populacional destas espécies tem aumentado visando o uso sustentável dos estoques e a manutenção da diversidade genética. No rio Paraguai, importante afluente do rio Paraná, os desembarques de *P. lineatus* têm permanecido constantes (CATELLA; ALBUQUERQUE, 2000). A principal diferença entre os dois rios reside na presença de numerosas usinas hidrelétricas no rio Paraná, e ausência das mesmas no rio Paraguai.

Muitas espécies têm sido introduzidas e estocadas em reservatórios com o objetivo de minimizar o decréscimo dos desembarques pesqueiros. Durante o período de 1979 a 1995, mais de 50 milhões de *P. lineatus* jovens foram estocados em reservatórios da bacia do rio Paraná (CESP, 1996), porém sem o conhecimento prévio da estrutura da população dentro da bacia do rio Paraná e sem considerações sobre avaliação e monitoramento genético. De acordo com Agostinho *et al.* (1994), os programas de estocagem e outras técnicas de manejo aplicadas para preservar os recursos pesqueiros no Brasil têm falhado em grande parte, devido à falta de monitoramento e avaliação. O manejo pesqueiro deveria incluir estratégias para minimizar os efeitos negativos das interações genéticas entre peixes cultivados e selvagens (FERGUSON, 1994), e no mínimo, deveria ser conhecida a estrutura populacional da população selvagem (ALLENDORF; UTTER, 1979; ALLENDORF; RYMAN, 1987).

Recentemente, várias técnicas de genética molecular têm tornado-se disponíveis para estudos populacionais (PARKER *et al.*, 1998). Estas técnicas incluem sequenciamento direto do DNA mitocondrial (APOSTOLIDIS *et al.*, 1997; DOUPÉ *et al.*, 1999; GLEESON *et al.*, 1999), a análise do polimorfismo de DNA mitocondrial e genômico clivados com enzimas de restrição (HARTLEY, 1995; BRYKOV *et al.*, 1996; MORÁN *et al.*, 1996; SAITOH, 1998; GOLD *et al.*, 1999), análise de polimorfismo de mini e microsátélites (TAYLOR *et al.*, 1994; BEACHAM *et al.*, 1996; MILLER *et al.*, 1996); e polimorfismo de fragmentos amplificados ao acaso- RAPD (NILSSON; SCHMITZ, 1995; BIELAWSKI; PUMO, 1997; CACCONE *et al.*, 1997; DERGAN *et al.*, 1998; SAITOH, 1998; KUUSIPALO, 1999; SEKINE, 2000).

A técnica de RAPD (WILLIAMS *et al.*, 1990) foi escolhida para este estudo por ser eficiente, econômica, usar quantidades limitadas de DNA e acessar regiões anônimas do genoma (HADRYIS *et al.*, 1992). No Brasil, ainda são poucos os estudos utilizando a técnica de RAPD em peixes de água doce como os estudos de Chiari (1999); Dergan *et al.* (1998); Sekine (2000); Wasko (2000); Hatanaka (2000); Almeida *et al.* (2001) e Prioli (2001).

Neste trabalho, empregamos a técnica RAPD para avaliarmos a diversidade genética de *P. lineatus* coletados na bacia do rio Paraná. Os resultados nos permitiram fazer inferências sobre o manejo desta espécie visando manutenção da biodiversidade.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta

Exemplares de *P. lineatus* foram coletados nas seguintes localidades (entre parênteses está a abreviação usada para designar cada local seguida pelo número de indivíduos analisados e meses de coleta): **Rio Miranda** (MI = 12, junho de 1999), **Rio Paraná** - a jusante da barragem de Itaipu (JI = 12, janeiro de 1999) e a jusante da barragem de Yaciretá (JY = 12, novembro de 1999), **Rio Baía** (BA = 10, maio de 1999) - este ponto de coleta não pode ser observado no mapa devido à escala utilizada, portanto foi indicado pelo símbolo “•”- e **rio Corumbá** (CO = 12, outubro e novembro de 1999)- afluente do rio Paranaíba. As localidades podem ser visualizadas na Figura 1. As amostras de tecido muscular e nadadeiras adiposas foram retiradas logo após a captura e armazenadas em etanol 95%. As amostras de Yaciretá foram obtidas após o término das análises do DNA mitocondrial na Texas A&M University.

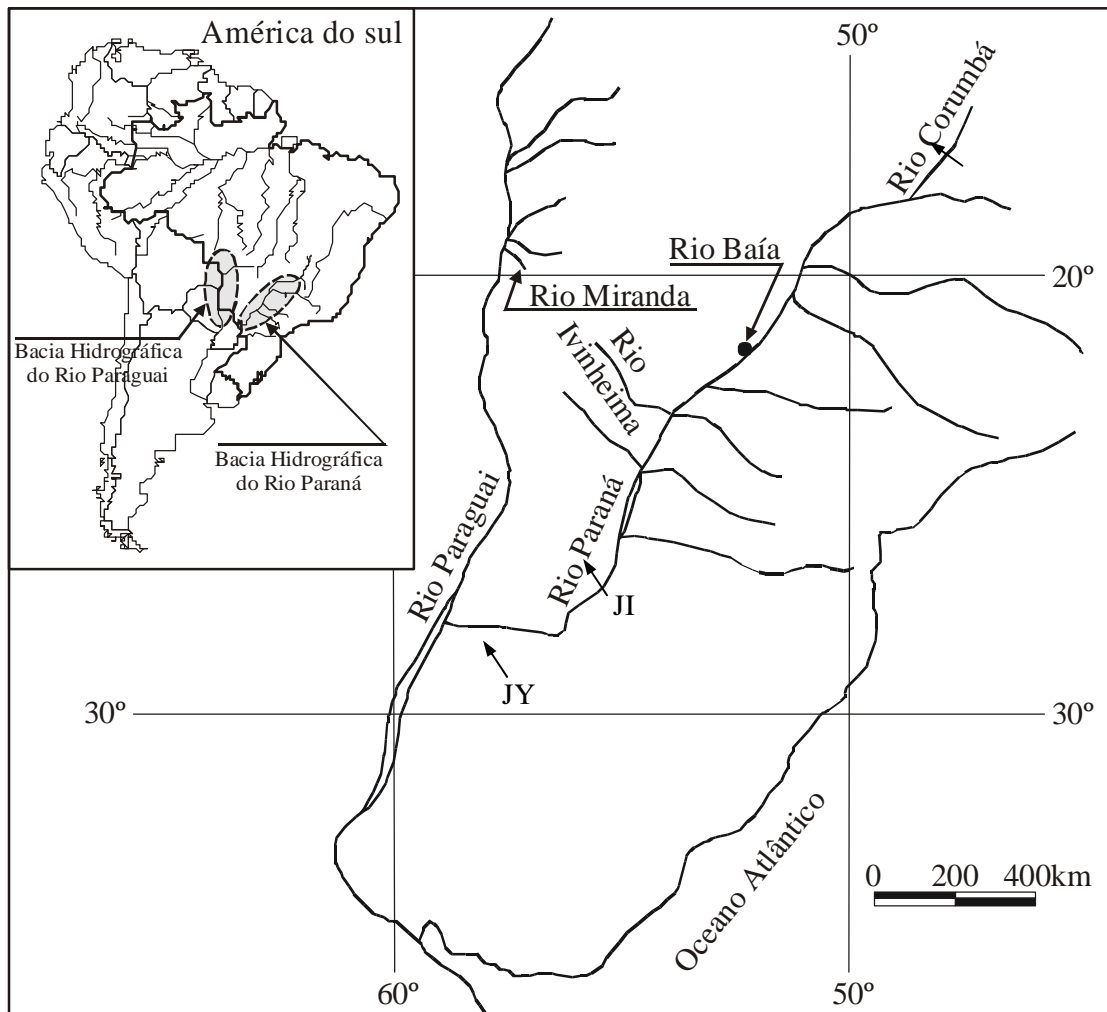


Figura 1 - Local de coleta das amostras de *Prochilodus lineatus* da bacia do rio Paraná. JY e JI correspondem ao ponto de coleta à jusante da hidrelétrica de Yacretá e Itaipu, respectivamente

4.2.2 Processamento das amostras

O DNA genômico foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Whitmore *et al.* (1992), com algumas modificações. Fragmentos de nadadeira adiposa ou tecido muscular de aproximadamente 50 mg preservados em etanol foram colocados em tubos de microcentrífuga contendo 500 μ L de tampão (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,1% SDS, 50 mM ditiotreitol e 50 μ g proteinase K) e deixados por aproximadamente 24 horas em banho-maria a 42 °C. Em seguida, o DNA foi purificado com uma extração com 500 μ L de fenol/Tris pH 8,0 e duas extrações com 500 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O DNA obtido foi precipitado 1 ml de etanol 100% e ressuscitado em aproximadamente 30 μ L de tampão 1/10 TE (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA) com RNase (20 μ g/mL). A suspensão foi então incubada em banho-maria a 37 °C por 1 hora para a digestão do RNA.

A estimativa da quantidade de DNA presente em cada amostra foi feita pela comparação com DNA do fago λ , de concentração conhecida, por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 %, diluída em tampão TBE (89 mM tris-base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA pH 8,0) em uma cuba contendo o mesmo tampão. Com base nestas estimativas, as amostras foram diluídas para a concentração de 5 ng/ μ L e quantificadas novamente.

A mistura de reação para amplificação foi preparada com um volume total de 13 μ L, contendo 10 ng DNA, 0,46 μ M de cada *primer*, 1 U Taq-DNA polimerase (Gibco BRL), 200 μ M de cada dNTP, 2 mM MgCl₂ e tampão (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl).

O programa de amplificação consistiu de uma etapa inicial de 4 minutos a 92 °C, seguidos de 40 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 1 minuto e 30 segundos a 40 °C e 2 minutos a 72 °C, e uma etapa final de 5 minutos a 72°C (Almeida *et al.*, 2001). Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram selecionados dos *kits* OPA, OPX e OPW (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA). Para a seleção dos *primers*, foram testados os DNAs de dois indivíduos. Após a amplificação, foram escolhidos os oligonucleotídeos que produziram maior quantidade de bandas e melhor repetibilidade comparando-se o resultado de duas reações de PCR. Devido a problemas com contaminação na etapa inicial do trabalho, os testes de repetibilidade foram realizados apenas com os *primers* que não apresentaram bandas no controle negativo. Portanto, a escolha dos *primers* usados neste estudo não indica que os demais primers dos *kits* testados não sejam adequados para uso em *P. lineatus*.

As amostras amplificadas para a comparação das populações foram aplicadas em gel de agarose 1,4 % diluído em tampão TBE, contendo brometo de etídeo (0,02 %) em cuba contendo o mesmo tampão. O géis foram submetidos a um campo elétrico de 3 V cm⁻¹ e após uma corrida de aproximadamente 10 cm, foram fotografados para análise posterior. Os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados foram estimados visualmente por comparação com o padrão DNA *Ladder* 100 pb (Gibco BRL)

4.2.3 Análise dos dados

Os padrões eletroforéticos de cada indivíduo foram comparados de acordo com a presença e ausência de bandas, as quais foram computadas com valores de 1 e 0, respectivamente.

Para testar as diferenças nas frequências dos marcadores (bandas) para cada população e para a população total (dados agrupados) foi utilizado o teste de Fisher (Raymond e Rousset, 1995) usando o aplicativo TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões eletroforéticos de RAPD gerados pelos *primers* podem ser visualizados na Figura 2.

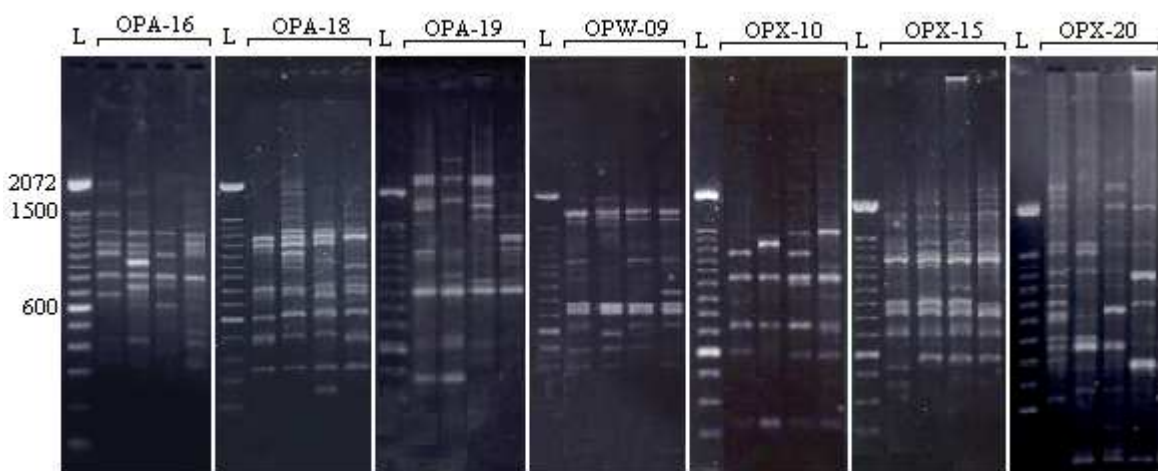


Figura 2 - Padrões eletroforéticos de RAPD obtidos a partir da amplificação com os sete *primers* utilizados para *P. lineatus* da bacia do rio Paraná. Os números à esquerda indicam o tamanho dos fragmentos do DNA Ladder 100 p.b., (Gibco BR). As amostras representam quatro indivíduos diferentes tomados ao acaso. As designações na parte superior da figura correspondem aos *primers* analisados

Os 86 locos gerados pelos *primers* OPW-09, OPA-16, OPA-18, OPA-19, OPX-10, OPX-15 e OPX-20, que foram selecionados com base no número, nitidez e repetibilidade de bandas, encontram-se listados na Tabela 1.

O número de locos gerados pelos *primers* variou de 4 a 19 e o tamanho aproximado dos fragmentos variou de 250 a 2200 p.b. O tamanho dos fragmentos em pares de bases está indicado por números subscritos à direita das bandas listadas na Tabela 1.

Dezesseis locos não foram detectados em pelo menos uma das cinco populações (Tabela 1). Com exceção do loco OPX20-09, nenhum outro apresentou resultado significativo para o teste exato de Fisher, tendo sido observados em baixa frequência nas populações onde foram detectados. Os locos OPA18-15 e OPX10-19 foram observados na população coletada a jusante da hidrelétrica de Yaciretá.

Tabela 1. Probabilidades do teste exato de Fisher para população total de *P. lineatus* da bacia do rio Paraná para todos os locos obtidos para RAPD, com o tamanho aproximado em pares de base subscrito à direita da designação de cada loco. • indica as bandas que não foram detectadas em pelo menos uma das cinco populações

Bandas	P	Bandas(cont.)	P
OPW9-01 ₁₇₅₀	1,0000	OPX10-05 ₁₃₉₀	0,5304
OPW9-02 ₁₇₀₀	0,5451	OPX10-06 ₁₃₀₀	0,2855
OPW9-03 ₇₅₀	0,5721	OPX10-07 ₁₂₅₀	0,1535
OPW9-04 ₇₁₀	0,0370*	•OPX10-08 ₁₁₅₀	0,1896
OPA16-01 ₁₂₂₀	0,1344	OPX10-09 ₁₁₀₀	1,0000
•OPA16-02 ₁₁₉₀	0,2485	•OPX10-10 ₁₀₅₀	0,7123
•OPA16-03 ₁₁₅₀	0,4594	•OPX10-11 ₉₃₀	0,0677
OPA16-04 ₁₀₉₀	0,7081	•OPX10-12 ₈₀₀	0,0836
OPA16-05 ₁₀₂₀	0,0252*	•OPX10-13 ₇₅₀	1,0000
OPA16-06 ₁₀₀₀	0,4734	OPX10-14 ₇₀₀	1,0000
OPA16-07 ₈₀₀	1,0000	OPX10-15 ₅₀₀	0,7163
•OPA16-08 ₇₇₀	0,3081	OPX10-16 ₆₀₀	1,0000
OPA16-09 ₇₅₀	0,7071	OPX10-17 ₅₅₀	0,9325
OPA16-10 ₇₁₀	0,4047	OPX10-18 ₃₀₀	1,0000
OPA18-01 ₁₄₀₀	0,4982	•OPX10-19 ₂₅₀	1,0000
OPA18-02 ₁₃₅₀	1,0000	OPX15-01 ₁₄₁₀	1,0000
OPA18-03 ₁₃₀₀	0,7972	OPX15-02 ₁₃₄₀	0,3446
OPA18-04 ₁₂₀₀	0,8809	OPX15-03 ₁₂₀₀	0,8800
OPA18-05 ₈₀₀	0,9061	OPX15-04 ₁₂₆₀	0,1952
OPA18-06 ₇₇₀	0,0450*	OPX15-05 ₉₀₀	0,0614
OPA18-07 ₇₅₀	0,1263	OPX15-06 ₈₁₀	0,0078**
OPA18-08 ₇₀₀	0,0136*	OPX15-07 ₇₂₀	1,0000
OPA18-09 ₆₈₀	0,7169	OPX15-08 ₇₀₀	1,0000
OPA18-10 ₆₆₀	0,4082	OPX15-09 ₆₀₀	0,7600
OPA18-11 ₆₀₀	0,1355	•OPX15-10 ₅₅₀	0,7652
OPA18-12 ₅₄₀	0,4776	OPX20-01 ₂₂₀₀	0,8307
•OPA18-13 ₅₀₀	0,2590	OPX20-02 ₂₁₅₀	0,6831
OPA18-14 ₄₀₀	1,0000	OPX20-03 ₂₁₀₀	0,3426
•OPA18-15 ₃₀₀	0,7903	OPX20-04 ₂₀₇₀	0,3583
OPA19-01 ₂₁₅₀	0,3386	•OPX20-05 ₁₉₀₀	0,3035
OPA19-02 ₁₉₅₀	1,0000	OPX20-06 ₁₅₀₀	0,0137*
OPA19-03 ₁₉₁₀	0,7851	OPX20-07 ₁₄₀₀	0,9678
OPA19-04 ₁₈₀₀	0,6710	OPX20-08 ₁₃₀₀	1,0000
•OPA19-05 ₁₄₀₀	0,6899	•OPX20-09 ₁₂₅₀	0,0311*
OPA19-06 ₁₀₉₀	0,2272	OPX20-10 ₁₀₂₀	0,2185
OPA19-07 ₉₉₀	0,7590	OPX20-11 ₉₅₀	0,5091
OPA19-08 ₉₂₀	0,1779	OPX20-12 ₉₂₀	0,4567
•OPA19-09 ₈₈₀	0,7307	OPX20-13 ₉₀₀	0,9546
OPA19-10 ₆₁₀	1,0000	OPX20-14 ₇₁₀	0,0195*
OPX10-01 ₂₁₀₀	0,5261	OPX20-15 ₆₅₀	0,5465
OPX10-02 ₁₇₅₀	1,0000	OPX20-16 ₆₀₀	0,6648
OPX10-03 ₁₅₀₀	1,0000	OPX20-17 ₅₅₀	0,7764
OPX10-04 ₁₄₃₀	0,4469	OPX20-18 ₂₉₀	0,9090
Pop. Total	163,3782		
		p = 0,6689	Df = 172

valores significativos $p \leq 0,05$ *, valores significativos $p \leq 0,01$ **

Os dados obtidos pelo teste exato Fisher para a população total (Tabela 1) e para as comparações entre pares de populações (dados não tabelados) sugerem que a população não se encontra estruturada considerando o conjunto de locos analisado, porém alguns locos apresentam heterogeneidade na frequência nas comparações entre duas populações (Tabela 5).

As comparações entre os pares JY x JI e JI x CO não apresentaram locos com resultados significativos para o teste exato de Fisher.

Tabela 5 - Probabilidades resultantes do teste exato de Fisher que detectaram heterogeneidade nas frequências dos locos entre as populações de *Prochilodus lineatus* da Bacia do rio Paraná

	MlxJY	MlxJI	MlxBA	MlxCO	JYxBA	JyxCO	BAxJI	BAxCO
OPA16.05			0,0291				0,0164	
OPA18.07					0,0345			
OPA18.08	0,0234			0,0026				
OPX10.11								0,0287
OPX10.12								0,0095
OPX15.05	0,0108	0,0401		0,0390				
OPX20.06			0,0389	0,0370				
OPX20.09						0,0245		
OPX20.14				0,0152				0,0089

A similaridade genética encontrada permite inferir que havia um intenso fluxo em um passado recente entre *P. lineatus* dos trechos superiores do rio Paraná e trechos superiores do rio Paraguai, corroborando com a hipótese de Agostinho *et al.* (1997), na qual algumas espécies migradoras, entre elas *P. lineatus*, seriam capazes de transpor a barreira geográfica formada pelos Saltos de Sete Quedas. O fato das bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai terem constituído uma grande e única bacia (MAACK, 1968), anterior ao surgimento da Serra do Maracajú, no Plioceno médio, que veio a constituir o divisor das bacias do rio Paraná e Paraguai (FULFARO; SUGUIO, 1994), assim como a alta capacidade migratória da espécie e o elevado tamanho da população parecem contribuir para grande homogeneidade verificada entre as populações. Resultados similares foram observados por Sivasundar *et al.* (2001) no seu estudo de seqüenciamento de genes mitocondriais. Estudos citogenéticos também indicam que espécies migradoras tendem a apresentar constituições cromossômicas mais estáveis (OLIVEIRA *et al.*, 1988).

As divergências genéticas entre as populações também podem ter sido causadas por uma não padronização do período de coleta, uma vez que a coleta nos rios Miranda e Baía foram realizadas fora do período de migração reprodutiva. Os peixes das demais localidades foram coletados durante o período reprodutivo e poderiam estar representando uma mistura de populações.

Em *LATES STAPPERSI* foram observadas divergências nas frequências de locos e consideradas resultantes de coleta em estações reprodutivas diferentes (KUUSIPALO, 1999) indicando que a presença de indivíduos migrantes pode alterar a estrutura genética local. As divergências observadas entre as populações do rio Baía e Paraguai sugeririam a existência de um fluxo preferencial dentro das bacias dos rios Paraná e Paraguai uma vez que foi observada

em experimentos de marcação e recaptura, a possível existência de migrantes ativos e passivos (BONETTO *et al.*, 1981).

Estas divergências também poderiam ser causadas devido a filopatria como descrita para outras espécies de peixes migradores (TALLMAN; HEALEY, 1994; HARTNEY, 1996; HODGSON *et al.*, 1998), porém estas considerações não são adequadas neste estudo devido ao pequeno número de populações amostradas, a não padronização do período de coleta e a falta de repetição em outro ano para verificar a manutenção do mesmo padrão de distribuição dos locos.

Divergências nas frequências das bandas analisadas por RAPD também foram observadas em outras populações de peixes migradores como *Brycon lundii* (WASKO, 2000) e *Prochilodus marggravii* (HATANAKA, 2000) coletadas à montante e à jusante da barragem de Três Marias, no rio São Francisco e em *P. corruscans* (SEKINE, 2000) coletada no rio Paraná.

Uma análise criteriosa deve ser considerada para que um único loco caracterize a estruturação de uma espécie e este dado seja usado como um padrão restritivo para utilização de reprodutores, uma vez que não se conhece o valor adaptativo oferecido pela presença ou ausência de determinada loco.

Pela inexistência de dados genéticos para o período anterior à construção das barragens, não podemos afirmar se estas divergências, originadas possivelmente por deriva genética, entre as localidades amostradas à montante e jusante da barragem de Itaipu tenham se desenvolvido pela presença das barragens de Yaciretá e Itaipu ou pela presença dos Saltos de Sete Quedas que poderiam exercer uma barreira parcial, pelo menos para parte da população. O mesmo poderia ser dito para as divergências observadas entre as populações coletadas nos rios Baía e rio Corumbá, já que entre estas duas localidades existem as barragens das hidrelétricas de Porto Primavera e Jupia, no rio Paraná, e São Simão, no rio Paranaíba, além da barragem da hidrelétrica de Corumbá, no rio Corumbá. Os resultados do presente estudo também sugerem que a restrição do movimento devido à construção das barragens não alterou, ainda, substancialmente a composição do DNA nuclear de *P. lineatus*, embora tenha sido observado o desenvolvimento de divergência nas frequências de alguns locos.

Sendo esta uma espécie migratória que depende das áreas alagadas das planícies para manter o recrutamento, podemos esperar que a regulação do fluxo das águas do rio Paraná e tributários, principalmente nos períodos de seca prolongada, poderá alterar a futura

composição genética da espécie - caso os programas de estocagem e monitoramento não sejam adotados.

6 CONCLUSÃO

As cinco populações de *P. lineatus* analisadas diferem significativamente quanto à diversidade genética de alguns locos, porém a análise estatística de Fisher para o conjunto de locos indica que esta espécie não está estruturada geneticamente, portanto podemos sugerir que as estocagens feitas anteriormente ao período de coleta para este estudo, assim como a presença das barragens não alterou significativamente a diversidade genética da espécie no trecho estudado.

Investigações adicionais na região dos trechos inferiores do rio Paraná são recomendadas, uma vez que foram detectados dois locos na população coletada à jusante da barragem de Yaciretá que não foram detectados nas demais populações.

A manutenção da integridade das planícies de inundação é indispensável para a preservação da biodiversidade genética desta espécie, pois os peixes jovens estocados necessitarão deste ambiente como local de refúgio e alimentação para atingirem a idade adulta e garantirem os recrutamentos futuros. É aconselhável que os peixes jovens cultivados em piscicultura sejam liberados na região de planície onde encontrarão condições mais favoráveis à sobrevivência e futura reprodução.

REFERÊNCIAS

- Agostinho, A.A., Julio Jr, H.F., Borgheti, J.r** (1992). Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso; reservatório de Itaipu. *Revista UNIMAR 14*: 89-114.
- Agostinho, A.A., Júlio Jr., H.F., Petreire Jr., M.** (1994). Itaipu reservoir (Brazil): Impacts of impoundment on the fish and fisheries. In: *Rehabilitation of Freshwater Fisheries* (Cowxi, G., ed.). Fishing News Book, Bodmin, UK, pp. 177-184.
- Agostinho, A.A., Julio Jr, H.F., Gomes, L.C., Bini, L. M., Agostinho, C.S.** (1997). Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: *A planície de inundação do alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos* (Vazzoler, A.E.A.M., Agostinho, A.A., Hahn, N.S., eds.). Editora da Universidade estadual de Maringá, Maringá, PR, pp. 179-208.

- Agostinho, A.A., Miranda, L.E., Bini, L.M., Gomes, L.C., Thomaz, S. M., Suzuki, H.I.** (1999). Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: *Theoretical reservoir ecology and its applications* (Tundisi, J.G., Straskraba, M., eds.). International Institute of Ecology. Brazilian Academy of Sciences and Backhuys Publishers. pp. 227-265.
- Allendorf, F.W., Ryman, N.** (1987). Genetic management of hatchery stocks. In: *Population Genetics & Fishery Management* (Ryman, N., Utter, F., eds.). University of Washington Press, Washington, pp. 141-159.
- Allendorf, F.W., Utter, F.M.** (1979). Population genetics. In: *Fish Physiology* (Hoar, W.S., Randal, D.J., Brett, J.R., eds.). Academic Press, New York, pp. 407-454.
- Almeida, F.S., Fungaro, M.H.P., Sodr e, L.M.K.** (2001). RAPD and isozyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the tibagi River, Brazil. *Journal of Zoology* (London): 253: 113-120.
- Apostolidis, A.P., Triantaphyllidis, C., Kouvatsi, A., Economidis, P.S.** (1997). Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brow trout) populations. *Molecular Ecology* 6: 531-542.
- Beacham, T.D., Withler, R.E., Stevens, T.A.** (1996). Stock identification of chinook salmon using minisatellite DNA variation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 380-394.
- Bielawski, J.P., Pumo, E.D.** (1997). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. *Hereditas* 78:32-40
- Black, W.C.** (1997). FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR markers in populations. Ft, Collins, Colorado: Colorado State University.
- Bonetto, A.A., Rold n, D., Veron, M.C.** (1981). Algunos aspectos estructurales y ecol gicos de la ictiofauna del sistema del Iber  (Corrientes, Rep. Argentina). *Ecosur* 8(15): 79-89.
- Bonetto, A.A.** (1986). Fish of the Paraná system. In: *The Ecology of River Systems* (Davies, B.R., Walker, K.F., eds.). Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 573-588.
- Brykov, V.A, Polyakova, N., Skurikhina, L.A., Kikhlevsky, A.D.** (1996). Geographical and temporal mitochondrial DNA variability in populations of pink salmon. *Journal of Fish Biology* 48: 899-909.
- Carvalho, G.R., Hauser, L.** (1995). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. In: *Molecular genetics in fisheries*. (Carvalho, G. R., Pitcher, T. J., eds). TJ Press (Padstow) Ltd.: Padstow, Cornwall. pp. 55-79.

- Caccone, A., Allegrucci, G., Fortunato, C., Sbordoni, V.** (1997). Genetic differentiation within the European sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR Assays. *Journal of Heredity* 88: 316-324.
- Catella, A.C., Albuquerque, F.F.** (2000). Sistema de controle da pesca do Mato Grosso do Sul. SCPESCA/MS-3, 1996. Corumbá: Embrapa Pantanal/SEMA-FEMAP, (Embrapa Pantanal.Boletim de Pesquisa Nº15). 48p.
- CESP** (1996). Aspectos limnológicos, ictiológicos e pesqueiros de reservatórios da CESP no período de 1986 a 1994/CESP - Série Pesquisa e Desenvolvimento, 136p.
- Chiari, L.** (1999). Análise da variabilidade genética em espécies da família Anostomidae (Pisces, Characiformes) da bacia do rio Tibagi. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 100p.
- Dergan, J.A., Suzuki, H.I., Shibatta, O.A., Duboc, L.F., Júlio Jr, H.F., Giuliano-Caetano, L., Black IV, W.C.** (1998). Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology* 21: 493-496.
- Doupé, R.G., Horwitz, P., Lymbery, A.J.** (1999). Mitochondrial genealogy of Western Australian barramundi: applications of inbreeding coefficients and coalescent analysis for separating temporal population process. *Journal of fish biology* 54: 1197-1209.
- Ferguson, M.** (1994). The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 351-73.
- Florian, F, Zerjal, T, Cattonaro, F., Edomi, P., Graziosi, G.** (1995). DNA polymorphism in *Dicentrarchus labrax* L. *Animal Biology* 4: 19-24.
- Fulfaro, V.J., Suguio, K.** (1974). O cenozóico paulista. Gênese e idade. In: Congresso Brasileiro de geologia, 28., Porto Alegre. Anais...Porto Alegre. p. 9-101.
- Gleeson, D.M., Howitt, R.L J., Ling, N.** (1999). Genetic variation, population structure and cryptic species within the Black mudfish, *Neochanna diversus*, an endemic galaxiid from New Zealand. *Molecular Ecology* 8: 47-57.
- Godinho, H.P., Godinho, A.L.** (1994). Ecology and conservation of fish in southern brazilian river basins submitted to hidroelectric impoudments. *Acta Limnologica Brasiliensia* 5: 187-197.
- Gold, J.R., Richardson, L.R., Turner, T.F.** (1999). Temporal stability and spatial divergence of mitochondrial DNA haplotype frequencies in red drum (*Scianopis ocellatus*) from coastal regions of the western Atlantic Ocean and Gulf of Mexico. *Marine Biology* 133: 593-602.
- Gomes, L.C., Agostinho, A.A.** (1997). Influence of the flooding regime on the nutritional state and juvenile recruitment of the curimba, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, in the upper Paraná River, Brazil. *Fisheries management and Ecology*. 4 (4): 263-274.

- Gomes L. C.** (1999). Factors affecting fishery yield from reservoirs of the upper Paraná River basin, Brazil. Tese de Doutorado. Mississippi State University, Mississippi. 81p.
- Hadrys, H., Balik, M., Schierwater, B.** (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.
- Hartley, S.E.** (1995). Mitochondrial DNA analysis distinguishes between British populations of the whitefish. *Journal of Fish Biology* 47 (A): 145-155.
- Hartney, K. B.** (1996). Site fidelity and homing behaviour of some kelp-bed fishes. *Journal of Fish Biology* 49: 1062-1069.
- Hatanaka, T.** (2000) Estudos de marcadores cromossômicos e moleculares no peixe *Prochilodus marginatus* (Prochilodontidae), uma espécie de interesse econômico no rio São Francisco. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, SP. 148p.
- Hodgson, J. R., Schindler, D.E., He, X.** (1998). Homing tendency of three piscivorous fishes in a north temperate lake. *Trans. Am. Fish. Soc.* 127: 1078-1081.
- Kuusipalo, L.** (1999). Genetic differentiation of endemic Nile perch *Lates niloticus* (Centropomidae, Pisces) populations in Lake Tanganyika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia* 407: 141-148
- Lynch, M., Milligan, B.G.** (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Maack.**(1968). Geografia física do Paraná. Curitiba: J. Olimpo: Secretaria da Cultura e do Esporte do Governo do Paraná. 450 p.
- Miller, K.M., Withler R.E., Beacham, T D.** (1996). Stock identification of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) using minisatellite DNA variation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 181-195.
- Morán, P.; Pendás, A.M., García-Vásquez, E.** (1996). Mitochondrial DNA variation in wild and hatchery brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Spain. *Aquaculture* 141: 59-65.
- Nei, M.** (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei, M.** (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nilsson, J., Schmitz, M.** (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) in Arctic char. *Nordic J. Freshw. Res.* 71: 372-377.
- Oliveira, C., Toledo, L.F.A., Foresti, F., Britski, H., Toledo-Filho, S.A.** (1988) Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. *Brazilian Journal of Genetics* 11 (3): 577-624.
- Parker, P.G.; Snow, A.A, Schug, A.A., Booton, G.C., Fuerst, P.A.** (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.

- Prioli, S.M.A.P.** (2001) Relações genéticas e filogenéticas entre espécies do gênero *Astyanax* do rio Iguaçu, analisados por marcadores de DNA mitochondrial e RAPD. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 47 p.
- Raymond, M.L, Rousset, F.** (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Revaldaves, E., Renesto, E., Machado, M. F. P. S.** (1997). Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Parana River. *Brazilian Journal of Genetics* 20: 381-388.
- Saitoh, K.** (1998). Genetic variation and local differentiation in the Pacific Cod *Gadus macrocephalus* around Japan revealed by mtDNA and RAPD markers. *Fisheries Science* 64: 673-679.
- Sekine, E. S., Prioli, A. J., Prioli, S, M. P., Júlio-Jr H. F.** (2002). Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassis, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paraná River. *Acta Scientiarum* 24: 507-512.
- Sivasundar, A, Bermingham, E., Ortí, G.** (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407-417.
- Tallman, R.F., Healey, M., C.** (1994). Homing, straying, and gene flow among seasonal separated populations of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51: 577-588.
- Taylor, E.B.; Beacham, T.D., Kaeriyama, M.** (1994). Population structure and identification of North Pacific Ocean Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) revealed by na analysis of minisatellite DNA variation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51: 1430-1442.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R.** (1973). Numerical taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco.
- Wasko, A.P.** (2000). Marcadores cromossômicos e moleculares no gênero *Brycon* (Characidae): uma contribuição à biologia evolutiva e à conservação biológica deste peixes. Universidade Federal de São carlos, SP. 172 p.
- Whitmore, D.H., Thai, T.H., Craft, C.M.** (1992). Gene amplification permits minimally invasive analysis of fish mitochondrial DNA. *Transaction of American Fisheries Society*. 121: 170-177.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, J., Rafalsski, J.A., Tingey, S.V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

Workman, P.L., Niswander, J.D. (1970). Population studies on southwestern Indian tribes.II.Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of human Genetics* 22: 24-49.

Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.