

HENRIQUE BUENO RUIZ

**Variabilidade genética de três espécies da família Callichthyidae da bacia
do alto rio Paraná, Brasil**

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
MARÇO - 2012

HENRIQUE BUENO RUIZ

**Variabilidade genética de três espécies da família Callichthyidae da bacia
do alto rio Paraná, Brasil**

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

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Renesto.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
MARÇO – 2012

Aos meus pais, Francisco Carlos Ruiz e Shirlei Bueno Ruiz, pela vigilância constante durante minha formação cultural e moral.

Com muito carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos.

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

Às minhas Coorientadoras, professora doutora Claudete Aparecida Mangolin e professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela dedicação durante a elaboração deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), por contribuírem diretamente com minha formação profissional, tornando possível a subida de mais este degrau, entre muitos que a vida me reserva.

Ao professor, doutor Claudio Henrique Zawadzki, pela ajuda na coleta e identificação dos peixes.

Aos meus amigos, senhor Juraci Batista de Araújo e Rosemir Bernardo Filho, pelo apoio durante a coleta.

A toda minha família, que tantas vezes me dirigiu palavras de estímulo, encorajando-me em todos os desafios.

Aos meus colegas de laboratório que, durante este período, permitiram tantas trocas de experiências.

A todos os não mencionados, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Henrique Bueno Ruiz, filho de Francisco Carlos Ruiz e de Shirlei Bueno Ruiz, nasceu em Umuarama, estado do Paraná, no dia 27 de abril de 1984.

Concluiu o Ensino Fundamental, na Escola Estadual Isa Mesquita, em Umuarama-PR, em 1997 e, no Colégio Estadual Professor Paulo Alberto Tomazinho, na mesma cidade e estado, em 2001, concluiu o Ensino Médio.

Em 2008, graduou-se em Ciências Biológicas, pela Universidade Paranaense (Unipar), também em Umuarama, Paraná.

Em 2010, iniciou o Curso de Mestrado, no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá.

SUMARIO

LISTA DE QUADROS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Ordem Siluriformes	3
2.2. Família Callichthyidae	4
2.3. <i>Hoplosternum littorale</i> (Hancock, 1828)	5
2.4. <i>Callichthys callichthys</i> (Linnaeus, 1758)	5
2.5. <i>Corydoras aeneus</i> (Gill, 1858)	6
2.6. Eletroforese de isoenzimas	6
2.7. Variabilidade genética de populações naturais	9
2.8. Genética da conservação.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Locais de coleta	13
3.2. Coleta e armazenagem	14
3.3. Eletroforese em gel de amido	15
3.4. Análise das isoenzimas.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÕES.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Nome, código internacional de enzima (nº E.C.), tecido, tampão e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido; (M = músculo; 1 = Tris-borato-EDTA; 2 = Tris-citrato)	17
Quadro 2 - Frequências alélicas das três espécies da família Callichthyidae da bacia do alto rio Paraná	19
Quadro 3 - Número de indivíduos analisados (N), número de locos polimórficos (P), porcentagem de locos polimórficos (P %), número de alelos por loco (K), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) de três espécies da família Callichthyidae analisadas. Entre parênteses o desvio padrão..	21
Quadro 4 - Valores de identidade genética padrão de Nei (acima da diagonal) e distancia genética de Nei (abaixo da diagonal) entre três espécies da família Callichthyidae da bacia do alto rio Paraná.	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa hidrográfico do estado do Paraná. O ponto de coleta no rio Paraná está indicado pela seta.....	13
Figura 2 - Mapa hidrográfico do Estado do Paraná. O ponto de coleta no rio Xambrê está indicado pela seta.....	14
Figura 3 - <i>Hoplosternum littorale</i> (comprimento padrão 13,34 cm). Exemplar não catalogado.....	14
Figura 4 - <i>Callichthys callichthys</i> (comprimento padrão 12 cm). Exemplar não catalogado.....	15
Figura 5 - <i>Corydoras aeneus</i> (comprimento padrão 4,4 cm). Exemplar não catalogado.....	15

RESUMO

RUIZ, Henrique Bueno. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2012. **Variabilidade genética de três espécies da família Callichthyidae da bacia do alto rio Paraná, Brasil.** Orientador: Erasmo Renesto. Coorientadora: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

A variabilidade genética das espécies *Callichthys callichthys*, *Corydoras aeneus* e *Hoplosternum littorale* foi estimada, utilizando a técnica de eletroforese em gel de amido, a partir de três populações coletadas na bacia do rio Paraná, sendo duas coletadas no rio Xambre-PR (*Callichthys callichthys*, *Corydoras aeneus*) e uma no rio Paraná (*Hoplosternum littorale*). Dez sistemas enzimáticos foram analisados: Aspartato aminotransferase (AAT; E.C. 2.6.1.1), Álcool desidrogenase (ADH; E.C. 1.1.1.1), Glicose-6-fosfato isomerase (GPI; E.C. 5.3.1.9), Glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH; E.C. 1.1.1.8), Isocitrato desidrogenase (IDH; E.C. 1.1.1.42), L-Lactato desidrogenase (LDH; E.C. 1.1.1.27), Malato desidrogenase (MDH; E.C. 1.1.1.37), Malato desidrogenase NADP⁺ (ME; E.C. 1.1.1.40), Fosfoglicomutase (PGM; E.C.5.4.2.2) e Peroxidase (PER; E.C. 5.4.2.2). Foram identificados 19 alelos em *H. littorale*, distribuídos em 18 locos, dos quais apenas um foi polimórfico; em *C. callichthys*, foram detectados 18 locos, com total de 25 alelos, sendo quatro polimórficos; em *C. aeneus*, 19 locos foram detectados, com total de 28 alelos, dos quais quatro apresentou-se polimórficos. A heterozigosidade média esperada foi 0,0119 na espécie *H. littorale*, 0,0505 em *C. callichthys* e 0,0578 em *C. aeneus*, evidenciando uma baixa heterozigosidade em *H. littorale*. Os valores de distância genética mostraram que as espécies são geneticamente diferentes, confirmando os dados da sistemática tradicional.

Palavras-chave: Callichthyidae, aloenzimas, variabilidade genética, heterozigosidade.

ABSTRACT

RUIZ, Henrique Bueno. M. Sc. State University of Maringá, February, 2012. **Genetic variability in three species of the family Callichthyidae of the upper Paraná river, Brazil** Advisor: Erasmo Renesto. Committee Member: Maria Claudia Colla Takasusuki Ruvolo.

The genetic variability of the species *Callichthys callichthys*, *Corydoras aeneus* and *Hoplosternum littorale* was estimated using the technique of starch gel electrophoresis, from three populations collected in the Paraná River basin, two collected in the river Xambre-PR (*Callichthys callichthys*, *Corydoras aeneus*) and one on the Parana River (*Hoplosternum littorale*). Ten enzyme systems were analyzed: aspartate aminotransferase (AAT; EC 2.6.1.1), alcohol dehydrogenase (ADH, EC 1.1.1.1), glucose-6-phosphate isomerase (GPI, EC 5.3.1.9), Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH, EC 1.1.1.8), Isocitrate dehydrogenase (IDH, EC 1.1.1.42), L-lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27), malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), malate dehydrogenase NADP + (ME, EC 1.1.1.40), phosphoglucomutase (PGM, EC 5.4.2.2) and Peroxidase (PER, EC 1.11.1.7). We identified 19 alleles *H. littorale*, over 18 loci, of which only one polymorphic, in *C. callichthys*, 18 loci were detected, with total of 25 alleles, four polymorphic, in *C. aeneus* 19 loci were detected, with total of 28 alleles, including four polymorphic. The average expected heterozygosity was 0.0119 in the species *H. littorale*, 0.0505 in *C. callichthys* and 0.0578 in *C. aeneus*, demonstrating a low heterozygosity in *H. littorale*. The genetic distances showed that species are genetically different, confirming the data of traditional systematic.

Keywords: Callichthyidae, allozymes, genetic variability, heterozygosity.

1. INTRODUÇÃO

A ictiofauna da região Neotropical (América do Sul e Central) é a mais diversificada do planeta, respondendo por aproximadamente 6.000 das 13.000 espécies de peixes de água doce. Destas, 4.475 já foram descritas e estima-se que provavelmente 1.550 ainda não o foram (Reis et al., 2003).

Os peixes desempenham papel fundamental enquanto componentes do ecossistema, participando da ciclagem de nutrientes e do fluxo de energia, como alimento básico para muitas aves e animais da região. Em função de sua expressiva diversidade de espécies, a ictiofauna constitui um valioso banco genético, estratégico para aplicações futuras (Vendel et al., 2005). A ictiofauna brasileira pode ser dividida em sete grupos principais: Characiformes (lambaris, dourados, curimatãs, etc.); Siluriformes, conhecidos como os peixes de couro ou de fundo (cascudos, mandi, surubim, jaú, bagres etc.); Cichlidae (acarás, tucunarés etc.); Cyprinodontiformes (barrigudinhos, guarus, etc.); invasores marinhos (grupo sem valor sistemático, que reúne raias, apapás, pescadas, linguados etc.) e relitos (pirambóia, pirarucu, peixe folha, aruanã) (Bizerril e Primo, 2001).

A ordem Siluriformes compreende 36 famílias, 478 gêneros e 3.093 espécies, sendo uma das mais especiosas, diversificadas e amplamente distribuídas dentre os peixes de água doce. A família Callichthyidae, uma das maiores entre os Siluriformes neotropicais, é constituída por 194 espécies agrupadas em oito gêneros (Ferraris, 2007). Seus representantes possuem vasta distribuição geográfica e este fator, associado à escassez de estudos anatômicos comparativos, dificulta hipóteses de relacionamento filogenético, sugerindo a necessidades de novas revisões taxonômicas (Reis, 1998).

Segundo estudos baseados em caracteres morfológicos e moleculares, Callichthyidae é considerada monofilética, compreendendo dois grupos naturais: Corydoradinae (*Aspidoras*, *Scleromystax* e *Corydoras*) e Callichthyinae (*Callichthys*, *Dianema*, *Hoplosternum*, *Lepthoplosternum* e *Megalechis*) (Reis, 1998; Britto, 2003; Shimabukuro-Dias et al., 2004).

A ictiofauna da bacia do rio Paraná é estimada em 600 espécies, (Laugiani, 2007), mas este número deve ser bem maior (Agostinho et al., 2007). Apesar de muitas espécies ainda não estarem descritas, as alterações promovidas em

ambientes aquáticos nas últimas décadas vêm ameaçando a perpetuação das populações naturais. Para efetivar a sua conservação, o valor da ictiofauna precisa ser rapidamente melhor apreciado em termos econômicos, científicos e ecológicos (Agostinho et al., 2007).

A abundância é uma das medidas do grau de adaptação da espécie ao seu ambiente (Fisch-Muller, 2003) que, da mesma forma que a adaptabilidade (capacidade de sobreviver e reproduzir em diferentes ambientes), está intimamente associada à variabilidade da espécie. De acordo com Vida (1994, p.10), “O futuro da diversidade de espécies está na diversidade genética das espécies. Quanto maior a diversidade genética mantida maior será a adaptabilidade, e, conseqüentemente, a probabilidade de sobrevivência da espécie em um mundo inconstante”.

Vários trabalhos visando ao monitoramento e à conservação da variabilidade genética das espécies de peixes que habitam a bacia do rio Paraná já foram desenvolvidos, com curimba (*Prochilodus lineatus*), cascudos (*Hypostomus* e *Loricariichthys*), Hemisorubim platyrhynchos, pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), morenitas (*Gymnotus*), traíra (*Hoplias aff. Malabaricus*) e com lambaris (*Astyanax altiparanae*) e tucunaré (*Cichla*). Porém, devido ao grande número de espécies de peixes desta bacia, muitas espécies ainda não foram estudadas (Machado, 2005).

Na bacia do rio Paraná, as espécies da família Callichthyidae são consideradas importante fonte de alimentos para muitas espécies piscívoras exploradas comercialmente. Devido à importância ecológica, o conhecimento da variabilidade genética é fundamental nas diretrizes de conservação.

O objetivo deste estudo foi estimar a variabilidade genética de três espécies da família Callichthyidae (*Hoplosternum littorale*, *Callichthys Callichthys* e *Corydoras aeneus*) em rios da bacia do rio Paraná e compará-la à de outras espécies da mesma bacia, procurando contribuir para um melhor entendimento da relação entre adaptação e variabilidade genética.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ordem Siluriformes

A ordem Siluriformes é formada por 36 famílias, com aproximadamente 478 gêneros, englobando cerca de 3090 espécies (Ferraris, 2007), sendo a ordem mais diversificada e bem distribuída. São popularmente conhecidos no Brasil com nomes populares como bagres, cascudos, armados, mandis, jaús ou pintados.

As principais características desse grupo são: corpo sem escamas, revestidos por uma pele espessa, ou por placas ósseas e barbilhões ao redor da boca, rudimentares ou desenvolvidos (Nakatani et al., 2001).

Na ordem Siluriformes, os peixes, em sua maioria, habitam ambientes de água doce, com exceção de duas famílias, Ariidae e Plotosidae, que compreendem espécies marinhas. Os peixes da ordem Siluriformes parecem ser limitados em sua distribuição pela temperatura, uma vez que a maioria habita as regiões Tropicais e Neotropicais e poucas são aquelas que alcançam o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (Nelson, 2006). O *Diplomystes*, silurídeo considerado mais primitivo, o único a possuir maxilar dentado, ocorre no extremo sul da América do Sul (Pinna, 1998). Além disso, as famílias Pimelodidae, Pangasiidae, Aspredinidae e Auchenipteridae incluem algumas espécies estuarinas, que podem, ainda, apresentar certa tolerância a ambientes marinhos (Pinna, 1998).

As espécies desta ordem apresentam hábitos sedentários e assumem desde pequeno até grande porte, apresentam grandes dificuldades em superar cachoeiras ou corredeiras que se impõem às suas raras migrações. São facilmente encontrados nos fundos dos rios, escondendo-se entre as pedras e vegetação (Bristski, 1981).

As atividades dos siluriformes são predominantemente crepusculares ou noturnas e os hábitos alimentares também são muito variados, com espécies herbívoras, planctófagas, carnívoras e onívoras. Quando utilizam seus sentidos químicos (olfato e gustação), estes saem à captura de alimentos, constituídos principalmente por vermes e insetos (Sterba, 1973). Além disso, há espécies com hábitos alimentares extremamente particulares, como os representantes de duas subfamílias de Trichomycteridae, os Vandelliinae, que são hematófagos, se alimentam de sangue das brânquias de outros peixes (Kelley e Atz, 1964; Machado

e Sazima, 1983) e os Stegophilinae, que são lepidófagos (comedores de escamas) (Nelson, 1994, 2006).

A ordem Siluriformes é foco de muitos estudos, tais como os sistemáticos, taxonômicos e genéticos, pois contém uma ampla diversidade ecológica e evolutiva (Burgess, 1989; Fink e Fink, 1981, 1996; Pinna, 1998; Arratia et al., 2003; Britto, 2003).

2.2. Família Callichthyidae

A família Callichthyidae, uma das maiores entre os Siluriformes neotropicais, é constituída por 194 espécies agrupadas em oito gêneros (Ferraris, 2007). A maioria das espécies desta família habita habitats diferentes, como pequenos riachos de águas rápidas, poças e locais pantanosos. Também podem sobreviver em águas com pouco oxigênio (Reis, 1998).

Muitas características identificam a família Callichthyidae, tais como: canal sensorial da linha lateral, reduzido com uma a seis placas; canal sensorial do pré-opérculo não conectado ao ramo pré-opercular; ossos infraorbitais expandidos, como placas; segundo infra orbital com uma expansão laminar interna, dando forma à parede posterior da órbita; pré-maxilar sem dentes; dentário com um processo mediano para a inserção dos músculos intermandibulares; abertura lateral da bexiga de gás parcialmente fechada por uma expansão oca (Reis, 1997; Brito, 2003). Apresentam também duas séries longitudinais de placas em cada lado do corpo, que lhes conferem uma armadura óssea. Devido a esta presença, eles são chamados de bagres blindados. Seu tamanho varia de 20 mm, nas pequenas espécies (gênero *Corydoras*) até 160 mm de comprimento (espécies dos gêneros *Callichthys* e *Hoplosternum*) (Reis, 2003, Menezes et al., 2007).

Segundo estudos baseados em caracteres morfológicos, a família Callichthyidae é formada por dois grupos naturais: Corydoradinae (*Aspidoras*, *Scleromystax* e *Corydoras*) e Callichthyinae (*Callichthys*, *Dianema*, *Hoplosternum*, *Lepthoplosternum* e *Megalechis*), (Reis, 1998; Britto, 2003; Shimabukuro-Dias et al., 2004).

O gênero *Hoplosternum* compreende três espécies: *H. littorale*, *H. magdalenae* e *H. punctatum*, comumente conhecidos como tamboatá, conseguem viver em habitats pobres em oxigênio (Ferraris, 2007, Affonso, 2001). Estas espécies

possuem alto valor comercial em países como Guiana Francesa e Suriname (Luquet et al., 1990).

No gênero *Callichthys* são válidas quatro espécies: *C. callichthys*, *C. fabricioi*, *C. aibaensis* e *C. serralabium*. Portanto, com sua taxonomia confusa, são geralmente identificados independentemente da localidade como *C. callichthys* (Ferraris jr. 2007, Reis 1998).

Segundo Reis (1998), o gênero *Corydoras* é difundido na América do Sul, compreendendo aproximadamente 142 espécies. Este gênero engloba cinco grupos naturais de espécies, que apresentam semelhanças em sua estrutura genética, (Oliveira et al., 1992) . Eventos vicariantes são mecanismos que ajudam a explicar a diversidade interespecífica elevada neste grupo (Weitzman et al., 1988). As espécies deste gênero são muito procuradas por aquaristas de todo o mundo, por apresentarem cores e formatos diferentes.

2.3. *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828)

H. littorale é um peixe de médio porte, coberto por placas dérmicas e conhecido popularmente no Brasil como tamoatá, caborja, camboja. Sua distribuição abrange varias drenagens cisandinas até a bacia do rio da Prata (Graça e Pavanelli, 2007). Vive em lagoas e canais, alimentando-se de insetos (Hahn et al, 1997) e apresenta respiração acessória que o torna apto a viver em áreas pantanosas pobres em oxigênio (Hostache e Mol, 1998).

Morfologicamente, *H. littorale* pode ser caracterizada por suas duas séries de placas em cada lado do corpo na forma de ziguezague, além de possuir uma boca pequena e terminal, projetada para frente, e um par de barbilhões em cada ricto (Santos et al., 1984).

2.4. *Callichthys callichthys* (Linnaeus, 1758)

Os peixes da espécie *Callichthys callichthys* possuem o corpo alongado, altura uniforme e coloração cinza escuro. As nadadeiras são escuras, com pintas cinzas. Possuem dois pares de barbilhões compridos, com comprimento total máximo de 150 mm (Graça e Pavanelli, 2007).

A alimentação dos peixes da espécie *Callichthys callichthys* é baseada em pequenos peixes, insetos e vegetais (Hahn, 2004). A espécie *Callichthys callichthys* é encontrada em pequenos riachos de águas rápidas e oxigenadas e até rios de grande porte, incluindo poças e locais pantanosos, onde o oxigênio pode estar totalmente ou parcialmente ausente (Reis, 1998). Sua distribuição vai de várias drenagens cisandinas até o norte de Buenos Aires (Graça e Pavanelli, 2007).

2.5. *Corydoras aeneus* (Gill, 1858)

Corydoras aeneus tem o corpo alto e contém uma grande mancha escura regular, de cor cinza-escuro, dorsalmente, e amarelo, ventralmente. As nadadeiras são escuras, sem pintas e o comprimento máximo pode chegar a 52 mm (Graça e Pavanelli, 2007). Encontrada em riachos, lagoas e canais, *Corydoras aeneus* alimenta-se de larvas de insetos e algas (Hahn, 2004) e sua distribuição vai da bacia de rios da Colômbia até o rio da Prata (Graça e Pavanelli, 2007).

2.6. Eletroforese de isoenzimas

As isoenzimas, ou isozimas foram definidas por Markert e Moller (1959) como formas múltiplas de uma mesma enzima que ocorre em um mesmo organismo, com afinidade sobre um mesmo substrato. O termo isoenzima define um grupo de inúmeras formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Por outro lado, o termo alozimas é empregado para apresentar isoenzimas por diferentes alelos de um mesmo loco (Prakash et al., 1969). A explicação do princípio básico de variação para os polimorfismos de isoenzimas é simples: as proteínas são cadeias de aminoácidos que refletem a expressão de um gene ativo no DNA (Torres et al., 2004).

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

mutação do DNA altera a estrutura protéica correspondente e nem toda substituição de aminoácidos altera a mobilidade eletroforética da enzima (Torres et al., 2004).

A eletroforese visa à separação de moléculas em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações, em suportes porosos e tampões apropriados, sob a influência de um campo elétrico contínuo (Alfenas, 2006). Estes suportes porosos são os géis que funcionam como um meio por onde as isoenzimas precisam passar, podendo ser de amido hidrolisado (Smithies, 1955), acetato de celulose ou de poliacrilamida. Posteriormente, enzimas escolhidas ou outras proteínas são coradas por soluções específicas em métodos histoquímicos (Hunter e Markert, 1957; Shaw e Prasad, 1970; Harris e Hopkinson, 1978; Richardson et al., 1986).

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

Os estudos usando a eletroforese de proteínas são vantajosos em relação ao uso de outros marcadores porque, ao trabalhar com moléculas de origem genética conhecida, as inferências são obtidas a partir de alelos ou genes situados em diferentes locos, de modo que, em quase todos os casos, a estrutura molecular é determinada e provavelmente livre de modificações ambientais. Portanto, entre populações relacionadas ou espécies, as diferenças na estrutura de proteínas provavelmente sejam genéticas (Thorpe e Solé-Cava, 1994).

A natureza invariavelmente codominante das isoenzimas constitui outra vantagem dessa técnica. Isto significa que os heterozigotos têm fenótipos diferentes dos homozigotos (Richardson et al., 1986; Murphy et al., 1990), podendo, assim, ser feita a discriminação dos indivíduos. A identificação dos homozigotos e heterozigotos torna o cálculo das frequências gênicas muito simples, sendo tais frequências utilizadas para a comparação das populações (Thorpe e Solé-Cava, 1994; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O uso da eletroforese é eficaz porque permite analisar um grande número de indivíduos, com um custo relativamente baixo. As condições de voltagem aplicadas

ao gel e o tempo de corrida variam de acordo com o tampão utilizado e a quantidade de amostra deve ser suficiente para que a reação enzima-substrato possa ser detectada por técnicas citoquímicas (Torres et al., 2004).

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

O papel das isoenzimas como marcadores genéticos possui, portanto, valor indiscutível para as diversas áreas básicas de pesquisa genética e apresentam potencial enorme para serem utilizadas juntamente com marcadores moleculares, monitorando o mapeamento de características quantitativas (Zawadzki et al., 2005).

A eletroforese de isozimas vem sendo utilizada nas últimas décadas para estimar os níveis de variabilidade genética e o fluxo gênico em populações naturais, no estudo da dispersão de espécies, análise de filogenias e hibridização natural, bem como no melhoramento de plantas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Murphy et al. (1996) citam outras aplicações: avaliação de paternidade e limites de espécies (aplicações intraespecíficas), estudo de processos de especiação, paleobiogeografia, taxas de evolução e origem de plantas poliplóides (aplicações interespecíficas). No entanto, a aplicação dessa técnica ao estudo de populações naturais de peixes só se expandiu a partir da década de 1970 (Utter, 1991). Durante as décadas de 1970 e 1980, a técnica da eletroforese de enzimas foi amplamente empregada no estudo de populações naturais de peixes nos países do hemisfério norte e na Austrália.

Os estudos aloenzimáticos em espécies da família Callichthyidae ainda não foram realizados, mas outros estudos com peixes da mesma ordem (Siluriformes) já foram desenvolvidos.

Paiva et al. (2005) pesquisaram a variabilidade genética de três populações da família Loricariidae, coletadas no ribeirão Maringá, no município de Maringá –

PR., onde foram analisados um total de 14 sistemas isoenzimáticos, 25 locos e 52 alelos.

Analisando 15 espécies de loricariídeos, Zawadzki et al. (2005) encontraram valores de heterozigosidade esperada bastante divergentes. Dentre estes, o menor foi de 0,019 para *Megalancistrus parananus* e o maior de 0,107 para *Hypostomus* sp. 1. Dentre todas as espécies analisadas neste trabalho, oito delas tiveram valores de H_e abaixo da média estabelecida por Ward et al. (1992) para peixes de água-doce ($H_e = 0,051$).

Philippsen et al. (2009) estimaram a variabilidade genética de quatro populações de *Neoplecostomus yapo* coletadas em diferentes regiões da bacia do rio Paranapanema, norte do estado do Paraná. Neste estudo, duas das populações analisadas apresentaram $H_e = 0,0195$ e $0,0179$, respectivamente, muito inferiores à média das espécies de peixes ($0,051$), apresentando, portanto, uma baixa variabilidade genética.

Em outro trabalho, Zawadzki et al. (2000), trabalhando com três espécies de *Loricariichthys*, encontraram 14,3% de locos polimórficos para as três espécies, com heterozigosidade esperada (H_e) variando de 0,023 a 0,050. Um total de 11 locos diagnósticos foi identificado, sendo, com cada espécie possuindo mais de um loco diagnóstico.

Lassala e Renesto (2007), analisando a heterozigosidade de 85 espécies de peixes tropicais, em relação a estratégias reprodutivas, evidenciaram que o grupo das espécies não migradoras, com cuidado parental, com fecundação interna, apresentaram menor média de heterozigosidade.

2.7. Variabilidade genética de populações naturais

Variabilidade genética pode ser entendida como a diversidade de alelos nos vários locos de uma determinada espécie (Solé-Cava, 2001). O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução da espécie (Allcock et al., 1995).

A variabilidade genética também pode ser usada como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas para verificar afinidades e limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de

migração e dispersão nas populações (Avice, 1994). Esta variabilidade pode ser quantificada por meio das frequências gênicas obtidas com a análise de isoenzimas. Pode-se considerar que os locos analisados representam uma amostra aleatória do genoma e, dessa maneira, seria representativa da população (Solferini, 2001).

As populações naturais, normalmente, têm altos níveis de variação genética (Nevo, 1978; Solé-Cava e Thorpe, 1991). Em peixes, essa variabilidade pode ser explicada, segundo Kirpichnikov (1981), pelo fato dos peixes representarem um grupo de animais primitivos altamente heterogêneos, submetido a processos evolutivos em diferentes direções. Já para Bush et al. (1977) e Lande (1979), a alta variabilidade está relacionada ao padrão de distribuição geográfica, uma vez que o isolamento das bacias hidrográficas favorecem o processo de especiação com a consequente formação de populações alopátricas.

A variação é introduzida continuamente nas populações por mutação ou migração de indivíduos de outras populações e é perdida por deriva genética, por endocruzamento e, no caso de genes não neutros, pela maior parte dos tipos de seleção natural (Nei, 1987). Por isso, populações naturais de peixes, estando isoladas em função da existência de acidentes geográficos, acumulam polimorfismos e divergências genéticas proporcionais à intensidade e ao tempo de isolamento.

A variabilidade genética é o legado evolutivo de uma espécie. Por isso, conhecimento e a manutenção da integridade genética de subunidades populacionais ou populações locais são aspectos fundamentais em programas de preservação e manejo da espécie. Porém, a perda da biodiversidade em ambientes aquáticos está entre os mais sérios problemas enfrentados pelos países ao redor do mundo (Moyle e Leidy, 1992).

A conservação genética de populações naturais e de recursos genéticos visa fornecer as bases para as decisões racionais concernentes à conservação da biodiversidade (Barker, 1994). Para isso, é de fundamental importância investimentos em conhecimento genético das espécies, nas áreas de taxonomia e filogenia. Pesquisas em genética de populações naturais de peixes têm contribuído muito para elucidação de questões relativas à estruturação de populações de diversas espécies, de sua origem e características peculiares, tais como sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas entre populações, migração, tamanho da população, seleção natural e eventos históricos (Parker et al., 1998; Sunnucks, 2000).

2.8. Genética da conservação

Um número muito grande de espécies encontra-se atualmente em processo de extinção (ou já se extinguiu) por fatores antrópicos. Em resposta, os cientistas têm tentando reverter este quadro com pesquisas que envolvem fatores ecológicos e genéticos das espécies, aplicando novas técnicas moleculares, possibilitando a análise genética de espécies ameaçadas. Estas análises têm sido amplamente aplicadas em pesquisas de conservação (Hedrick, 2001).

A genética da conservação foi criada há cerca de 30 anos e os primeiros livros sobre o assunto foram publicados no início da década de 80 (Solé-Cava, 2001). Naquela época, a aplicabilidade da genética da conservação resumia-se ao estudo da variabilidade genética de populações naturais e à extrapolação desses dados para o cálculo do tamanho efetivo das populações ameaçadas ou que haviam sofrido estrangulamentos populacionais (Soulé, 1980).

Historicamente, a eliminação de endocruzamentos e a manutenção da variação genética constituem os dois principais pontos da genética da conservação (Loescheke et al., 1994). Contudo, com o avanço das técnicas de pesquisas moleculares e com o maior entendimento entre conservacionistas e geneticistas, a genética da conservação passou a ser uma ciência extremamente útil para resolver problemas de conservação (Solé-Cava, 2001). Hoje, a genética vem sendo aplicada para a conservação de inúmeras espécies, dos mais diferentes grupos taxonômicos (Hedrick, 2001; Frankham et al., 2004).

A genética da conservação tem sido muito utilizada para os peixes. Habitats com áreas extremamente degradadas, pesca predatória, introdução de espécies exóticas são apenas alguns fatores que tornaram muitos grupos de peixes ameaçados de extinção (Vrijenhoek, 1998). Desta forma, esta disciplina pode ser aplicada para resolver problemas taxonômicos, para entender sistemas de cruzamento naturais e fatores que contribuem para o sucesso reprodutivo (fitness), para detectar variações intra e interpopulacionais, no manejo do fluxo gênico e, por último, em programas de melhoramento (Vrijenhoek, 1998).

Podemos considerar três tipos de variações genéticas que podem ser aplicadas à conservação: neutras, deletérias e adaptativas. Segundo Hedrick (2001), as variações neutras são aquelas em que a presença não interferirá nas taxas evolutivas da espécie. As variações deletérias podem prejudicar a população quanto

à sua capacidade de adaptação. Já as adaptativas aumentam as taxas evolutivas ou o sucesso reprodutivo da espécie. As variações deletérias são extremamente prejudiciais quando existe o endocruzamento, pois este pode aumentar a frequência de homozigotos para alelos deletérios.

Em populações em vias de extinção, a redução do número de indivíduos leva à perda de variabilidade. Mesmo que a população volte a crescer, a variabilidade genética pode permanecer pequena, ou ser recuperada muito lentamente (Solé-Cava, 2001). Assim, a redução de 10% do tamanho de uma população pode levar à redução de 10 a 25% da variabilidade genética desta população (Franklin e Franham, 1998). Populações com baixo número de indivíduos e com baixa variabilidade freqüentemente se extinguem, sendo necessário que a conservação se volte à manutenção da heterozigosidade e à diminuição de endocruzamentos. Em programas de conservação, a mitigação dos efeitos de deriva e endocruzamento, por meio de mecanismos que favoreçam à expansão do tamanho efetivo populacional, caracterizam-se como boas medidas para diminuir os riscos de extinção desta espécie (Solé-Cava, 2001).

O estudo das estruturas populacionais por meio de técnicas moleculares talvez seja a parte mais importante da genética da conservação e tem sido útil tanto no estudo de populações exploradas comercialmente (abundantes, mas com riscos populacionais devido à superexploração), como nas espécies já ameaçadas de extinção (Solé-Cava, 2001).

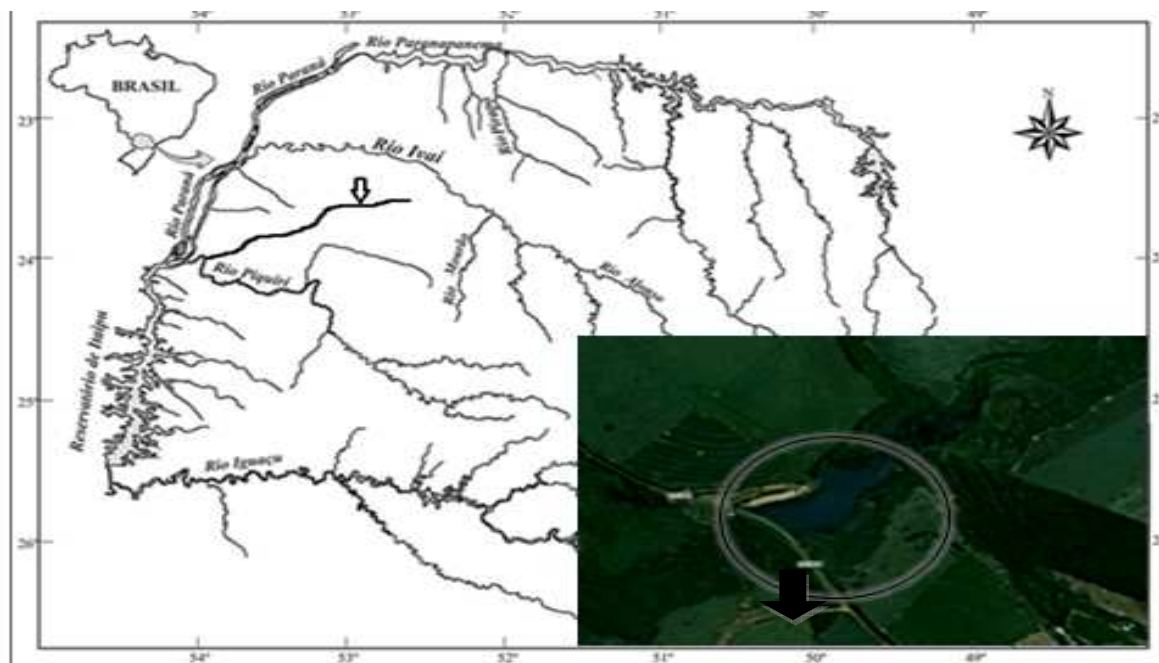


Figura 2 - Mapa hidrográfico do estado do Paraná. O ponto de coleta no rio Xambrê está indicado pela seta.

3.2. Coleta e armazenagem

As coletas foram realizadas no período de maio de 2011 a agosto de 2011 e resultaram na captura de 105 exemplares, sendo 54 de *Hoplosternum littorale* (Figura 3), 25 de *Callichthys callichthys* (Figura 4), 26 de *Corydoras aeneus* (Figura 5). Amostras de músculo e fígado (apenas de *H. littorale*) foram retiradas e conservadas em baixa temperatura (-20°C), até a extração das enzimas.



Figura 3 – *Hoplosternum littorale* (comprimento padrão 13,34 cm). Exemplar não catalogado.



Figura 4 – *Callichthys callichthys* (comprimento padrão 12 cm). Exemplar não catalogado.



Figura 5 – *Corydoras aeneus* (comprimento padrão 4,4 cm). Exemplar não catalogado.

3.3. Eletroforese em gel de amido

As amostras dos tecidos (músculo branco) foram homogeneizadas com bastão de vidros em tubos de propileno (1,5 ml), com 100 μ L gotas de tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5. O extrato protéico foi aplicado no gel de amido de milho (penetrose 50) a 15% (Val et al., 1981) com pequenas tiras de papel-filtro (4 mm x 8 mm) Whatman 3MM®, embebidas com as amostras e, em seguida, foi submetido à eletroforese horizontal contínua, sob refrigeração. Duas soluções tampão foram utilizadas: Tris 0,135M/Acido cítrico 0,043M, pH 7,0 (TC), diluído 15 vezes na preparação do gel; e Tris 0,18M/Acido bórico 0,1M/EDTA 0,004M, pH 8,6 (TBE), diluído quatro vezes na preparação do gel.

As corridas eletroforéticas duraram 17 horas, sob uma corrente elétrica de aproximadamente 50 V nas extremidades do gel. Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado horizontalmente em duas fatias, as quais foram incubadas com soluções

histoquímicas específicas, necessárias para a revelação das bandas de atividade enzimática de cada sistema, preparadas segundo protocolo de Murphy et al. (1996).

3.4. Análise das isoenzimas

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

Os dados foram analisados no programa Popgene 3.1 (Yeh, 1999). A variabilidade genética foi estimada pelo cálculo da heterozigosidade (H_e e H_o), de acordo com Nei (1978). Com os valores das frequências alélicas, a identidade (I) e a distância genética (D) de Nei (1978) foram calculadas e, a partir desta última, foi construído um dendrograma (método de agrupamento pelo algoritmo UPGMA - Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means) das populações estudadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela técnica de eletroforese de gel de amido, foram analisados 10 sistemas enzimáticos (Quadro 1) de 105 indivíduos de três espécies de peixes da família Callichthyidae, sendo 54 indivíduos da espécie *Hoplosternum littorale*, 25 indivíduos da espécie *Callichthys callichthys* e 26 indivíduos da espécie *Corydora aeneus*, nas quais foram detectados 19 locos (Quadro 2) e um total de 54 alelos.

Foram detectados 19 alelos em *H. littorale*, distribuídos em 18 locos, sendo apenas um polimórfico (*Gpi-1*); em *C. callichthys* foram detectados 18 locos, com total de 25 alelos em *C. aeneus* 19 locos, com total de 28 alelos. Nestas duas espécies, quatro locos foram polimórficos.

Quadro 1 - Nome, código internacional de enzima (nº E.C.), tecido, tampão e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido; (M = músculo; 1 = Tris-borato-EDTA; 2 = Tris-citrato)

Enzima (abreviação)	nº E.C.	Tecido	Tampões	E. Q.
Aspartato aminotransferase (AAT)	2.6.1.1	M	1	Dimérica
Álcool desidrogenase (ADH)	1.1.1.1	M	2	Dimérica
Glicerol-3-fosfato (G3PDH)	1.1.1.8	M	1	Dimérica
Glucose fosfato isomerase (GPI)	5.3.1.9	M	2	Dimérica
Isocitrato desidrogenase (IDH)	1.1.1.41	M	2	Dimérica
L-Lactato desidrogenase (LDH)	1.1.1.27	M	2	Tetramérica
Malato desidrogenase (MDH)	1.1.1.37	M	2	Dimérica
Enzima málica (ME)	1.1.1.40	M	1	Tetramérica
Peroxidase (PER)	1.11.1.7	M	1	Tetramérica
Fosfoglicomutase (PGM)	5.4.2.2	M	1	Monomérica

O Quadro 2 mostra as frequências alélicas de cada loco de cada espécie. A enzima Aspartato aminotransferase (AAT), apresentou dois locos: *Aat-1*, que codifica as enzimas catódicas e *Aat-2*, que codifica as enzimas anódicas. O loco *Aat-1* foi monomórfico para as três espécies, com alelos diferentes em cada uma. No loco *Aat-2*, foram identificados quatro alelos para a espécie *C. callichthys*, em equilíbrio Hardy-Weinberg e três para *C. aeneus*, mas não em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em outras espécies de peixes da ordem Siluriformes, a enzima ATT expressou um loco (Zawadzki et al., 2000; Zawadzki et al., 2004a), dois locos (Zawadzki et al., 2004b; Paiva et al., 2005), e três locos (Zawadzki, 1996; Zawadzki et al., 1999).

A enzima ADH foi expressa com apenas um loco monomórfico para todas as espécies. Em outras famílias de peixes, ADH mostrou também apenas um loco gênico (Revaldaves et al. 1997; Renesto et al. 2001; Peres et al., 2002). Analisando 15 espécies de peixes da família Loricariidae, Zawadzki et al. (2005) encontraram variação em oito delas e um total de cinco alelos para o mesmo loco, evidenciando que a enzima ADH costuma apresentar variação.

No sistema enzimático G3PDH, a enzima apresentou-se codificada por dois locos *G3pdh-1* e *G3pdh-2*, sendo que o único loco polimórfico foi expresso em *C. callichthys* com dois alelos. Em outras espécies de Loricariidae, esta enzima tem se apresentado com dois locos monomórficos (Zawadzki et al., 1999; Zawadzki et al., 2004a; Paiva et al., 2005).

Dois locos para a enzima GPI foram detectados: *Gpi-B*, monomórfico em *C. callichthys* e polimórficos em *C. aeneus* e *H. littorale*; e *Gpi-A*, monomórfico em *H. littorale* e polimórfico em *C. aeneus* e *C. callichthys*. Os locos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção de *Gpi-B* em *C. aeneus*. Este loco pode não estar em equilíbrio devido a fatores diferenciados, como endocruzamento, seleção natural, deriva genética, podendo levar uma espécie a não se encontrar em equilíbrio de Hardy-Weinberg para um determinado loco (Nei, 1987).

A enzima IDH apresentou para todos os indivíduos uma única banda monomórfica. O trabalho desenvolvido por Limeira et al. (2009), estudando duas populações de *Rineloricaria pentamaculata*, apresentou os mesmos resultados com uma única banda, evidenciando homozigose em todos os indivíduos. Zawadzki et al. (2004b), estudando espécies de *Hyspostomus* do ribeirão Keller, encontram dois locos para IDH e variação em apenas uma espécie.

Dois locos foram observados para LDH: *Ldh-A* e *Ldh-B*. Todos os indivíduos mostraram locos em homozigose. Em outras famílias estudadas, a variação também foi pequena. Zawadzki et al. (2005) encontraram variação em apenas três espécies, das 15 estudadas, para um dos locos de LDH e em duas para outro.

A enzima MDH expressou três locos e todos se mostraram monomórficos nas três espécies. O mesmo foi obtido no trabalho de Limeira et al. (2009), no qual foi encontrado três locos para esta enzima. No loco *Mdh-A*, as três espécies expressaram o mesmo alelo, enquanto no loco *Mdh-B* os alelos são diferentes. Outros autores também constataram a presença de três locos para esta enzima em peixes da família Loricariidae (Paiva et al., 2005; Zawadzki et al., 2005; Paiva 2006).

Dois locos para a enzima ME foram encontrados, denominados de *Me-1* e *Me-2*, os quais não apresentaram variação. O mesmo padrão foi encontrado em *Loricariichthys platymetopon*, por Machado (2005), e em *Hypostomus*, por Paiva et al. (2005).

Para a izoenzima PGM, foram encontrados dois locos: *Pgm-1*, que se expressa nas três espécies, e *Pgm-2*, que se expressa somente em *C. aeneus*. O loco *Pgm-1* apresentou polimorfismo nas espécies *C. callichthys* e *C. aeneus*, com dois alelos em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O loco *Pgm-2*, expresso somente em uma das espécies, foi monomórfico. Trabalhando com duas espécies do gênero *Neoplecostomus*, Reusing et al. (2009) detectaram um loco para enzima PGM. Ito et al. (2009) e Limeira et al. (2009) também encontraram apenas um loco para esta enzima, porém sem variação.

O sistema enzimático PER apresentou duas bandas, interpretadas como *Per-1* e *Per-2*, não apresentando polimorfismo em nenhum dos locos. Phillipsen et al. (2009) e Reusing et al. (2009) encontraram os mesmos resultados trabalhando com espécies de *Neoplecostomus*, da família Loricariidae. Renesto et al. (2006), trabalhando com populações de *Hypostomus*, observaram três locos para esta enzima, sendo todos monomórficos.

Quadro 2 - Frequências alélicas das três espécies da família Callichthyidae da bacia do alto rio Paraná

Locos	Alelos	<i>Hoplosternum littorale</i>	<i>Callichthys callichthys</i>	<i>Corydoras aeneus</i>
<i>Aat-1</i>	<i>a</i>	--	1,0000	--
	<i>b</i>	1,0000	--	--
	<i>c</i>	--	--	1,0000
<i>Aat-2</i>	<i>a</i>	--	0,1000	--
	<i>b</i>	--	0,7800	0,0385
	<i>c</i>	1,0000	0,1000	0,0385
<i>Adh</i>	<i>d</i>	--	0,0200	0,9231
	<i>a</i>	--	--	1,0000
	<i>b</i>	1,0000	1,0000	--
<i>Gpdh-1</i>	<i>a</i>	--	--	1,0000
	<i>b</i>	1,0000	1,0000	--
<i>Gpdh-2</i>	<i>a</i>	--	--	1,0000
	<i>b</i>	1,0000	0,9400	--
	<i>c</i>	--	0,0600	--

Quadro 2, cont...

<i>Gpi-B</i>	<i>a</i>	--	--	0,1429
	<i>b</i>	--	1,0000	0,5714
	<i>c</i>	0,1204	--	0,2143
	<i>d</i>	0,8796	--	0,0714
<i>Gpi-A</i>	<i>a</i>	--	--	0,0577
	<i>b</i>	--	0,0400	0,9038
	<i>c</i>	1,0000	0,9000	0,0385
	<i>d</i>	--	0,0600	--
<i>Idh</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000	--
	<i>b</i>	--	--	1,0000
<i>Ldh-A</i>	<i>a</i>	--	--	1,0000
	<i>b</i>	1,0000	--	--
	<i>c</i>	--	1,0000	--
<i>Ldh-B</i>	<i>a</i>	--	--	1,0000
	<i>b</i>	1,0000	--	--
	<i>c</i>	--	1,0000	--
<i>Mdh-A</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000	1,0000
	<i>a</i>	--	--	1,0000
<i>Mdh-B</i>	<i>b</i>	--	1,0000	--
	<i>c</i>	1,0000	--	--
	<i>a</i>	--	--	1,0000
<i>Mdh-C</i>	<i>b</i>	--	1,0000	--
	<i>c</i>	1,0000	--	--
	<i>a</i>	--	--	1,0000
<i>Me-1</i>	<i>b</i>	--	1,0000	--
	<i>c</i>	1,0000	--	--
	<i>a</i>	--	--	1,0000
<i>Me-2</i>	<i>b</i>	--	1,0000	--
	<i>c</i>	1,0000	--	--
	<i>a</i>	--	0,1400	--
<i>Pgm-1</i>	<i>b</i>	--	0,8600	0,0962
	<i>c</i>	1,0000	--	--
	<i>d</i>	--	--	0,9038
<i>Pgm-2</i>	<i>a</i>	--	--	1,0000
	<i>a</i>	--	--	1,0000
<i>Per-1</i>	<i>b</i>	--	1,0000	--
	<i>c</i>	1,000	--	--
<i>Per-2</i>	<i>a</i>	--	--	1,0000
	<i>b</i>	--	1,0000	--
	<i>c</i>	1,0000	--	--

O Quadro 3 mostra uma síntese dos resultados de variabilidade genética nas três espécies. Observando estes resultados, pode-se verificar que *H. littorale*, teve uma proporção de locos polimórficos de 5,26% e somente um loco foi diagnosticado polimórfico. Outros trabalhos obtiveram resultados semelhantes com

outras espécies. Reusing et al. (2009), trabalhando com *Neoplecosotomus*, obteve para uma das espécies estudadas somente um loco polimórfico.

Quadro 3 - Número de indivíduos analisados (N), número de locos polimórficos (P), porcentagem de locos polimórficos (P %), número de alelos por loco (K), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) de três espécies da família Callichthyidae analisadas. Entre parênteses o desvio padrão

Variáveis	<i>Hoplosternum littorale</i>	<i>Callichthys callichthys</i>	<i>Corydoras aeneus</i>
N	54	25	26
P	1	4	4
P %	5,26	21,05	21,05
K	1,0556 (1,2357)	1,3889 (0,8498)	1,4211 (0,9016)
H_o	0,0134 (0,0567)	0,0489 (0,1032)	0,0514 (0,1211)
H_e	0,0119 (0,0504)	0,0505 (0,1076)	0,0578 (0,1457)
$H_e - H_o / H_e$	-0,1260	-0,0317	-0,1107

Nas outras duas espécies do presente estudo, a proporção de locos polimórficos foi 21,05%. Limeira et al. (2009), trabalhando com espécies de *Rineloricaria*, encontraram polimorfismo em 13,64% dos locos para a população do ribeirão Keller e 9,09% para a população do rio São João. Zawadzki et al. (1999), utilizando três populações de *Hypostomus* da bacia do rio Iguaçu, encontraram porcentagem de locos polimórficos que varia de 20 a 40%. Paiva et al. (2005), estudando três espécies de *Hypostomus* do ribeirão Maringá, detectaram 20% de locos polimórficos para *H. strigaticeps* e *Hypostomus* sp. 1, não sendo detectado polimorfismo para *Hypostomus* sp. 2. Paiva (2006), estudando quatro populações de *Hypostomus* detectou 57,14% de locos polimórficos para *Hypostomus* sp. 1 e *H. hermanni*, 21,43% para *H. regani* e nenhum loco polimórfico para *H. albopunctatus*.

Levando em consideração os mesmos 12 sistemas enzimáticos analisados no presente trabalho, a média de H_e foi de 0,0119, na espécie *H. littorale*, media abaixo do valor 0,051 para espécies de peixes em geral (Ward et al., 1992). Para *C. callichthys*, a H_e obteve uma media quase parecida com a de peixes com valor de 0,0505. Contudo, em *C. aeneus*, o valor de $H_e = 0,0578$ é um pouco maior que a média estimada por Ward et al. (1992). Analisando duas populações de espécies da família Loricariidae da bacia do rio Iguaçu, Zawadzki et al. (1999) encontram valores baixos de H_e (0,011 e 0,017). Paiva (2006) encontrou valores maiores para a espécie de *Hypostomus* que variam de 0,172 em *H. hermani* a 0,000 para *H.*

albopunctatus. Em outro trabalho, Zawadzki et al. (2005) encontraram valores altos de H_e para espécies da família Loricariidae da bacia do rio Paraná.

Esta baixa heterozigosidade na espécie *H. littorale* pode estar relacionada com o habitat do qual foi capturada. Sendo lagoas, neste tipo de habitat, pode haver cruzamentos entre parentes e também por ser uma espécie que apresenta cuidado parental e não migradora.

A espécie *C. callichthys* também apresenta cuidado parental e exibiu uma heterozigosidade maior que *H. littorale*. Este resultado poderia estar relacionado com o habitat onde vive, sendo um riacho com várias barreiras geográficas (cahoieiras e barragens). Lassala e Renesto (2007), analisando a heterozigosidade de 85 espécies de peixes tropicais, em relação a estratégias reprodutivas, mostraram que o grupo das espécies não migradoras, com cuidado parental, com fecundação interna, tinham a menor média de heterozigozidade.

O Quadro 4 apresenta os valores de Identidade e distância genética, padrão de Nei (1978), entre as três espécies. Pode-se verificar pelos dados que as três espécies são geneticamente muito diferentes entre si. Isso mostra que a eletroforese de enzimas confirma os dados da sistemática tradicional que as coloca em gêneros diferentes.

Quadro 4 - Valores de identidade genética padrão de Nei (acima da diagonal) e distancia genética de Nei (abaixo da diagonal) entre três espécies da família Callichthyidae da bacia do alto rio Paraná

Espécie	<i>Hoplosternum Littorale</i>	<i>Callichthys callichthys</i>	<i>Corydoras aeneus</i>
<i>H. littorale</i>	****	0,3407	0,0653
<i>C. callichthys</i>	1,0768	****	0,1016
<i>C. aeneus</i>	2,7285	2,2866	****

Apesar da baixa heterozigosidade estimada para as três espécies, foi observado um excesso de heterozigotos nas amostras analisadas. No entanto, este excesso está limitado a poucos locos, pois a maioria é monomórfica. Este resultado poderia ser explicado por seleção a favor dos heterozigotos nestes locos.

5. CONCLUSÕES

As análises dos 10 sistemas enzimáticos, pela técnica de eletroforese de isoenzimas nas três espécies da família Callichthyidae, permitiram as seguintes conclusões:

a) A variabilidade genética da espécie *Hoplosternum littorale* foi considerada mais baixa que a média das populações de água doce. As outras duas espécies analisadas tiveram resultados próximos da média das populações de água doce.

b) Os valores de identidade genética de Nei mostraram que as três espécies são geneticamente muito diferentes entre si. Isto demonstra que a eletroforese de enzimas confirma os dados da sistemática tradicional que as coloca em gêneros diferentes.

c) O excesso de homozigotos observados na espécie *H. littorale* pode estar relacionado ao habitat de onde foi capturada, ou seja, lagoas, local que facilita os cruzamentos entre parentes e também por ser uma espécie que apresenta cuidado parental e não migradora.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: EDUEM, 2007. 501p.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 2006. 627p.
- ALLCOCK, A.L.; CHAUVET, M.; CRANDALL, K.A.; GIVEN, D.R.; HALL, S.J.G.; IRIONDO, J.M.; LEWINSOHN, T.M.; LYNCH, S.M.; SOLÉ-CAVA, M.; STACKEBRANDT, E.; TEMPLETON, A.R.; WATTS, P.C. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: HEYWODDO, V.H.; WATSON, R.T. (eds.). **Global biodiversity assessment**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 57-88.
- ARRATIA, G. Catfish head skeleton and the siluriform postcranial skeleton. In: ARRATIA, G.; KAPOOR, B.G.; CHARDON, M.; DIOGO, R. (eds.). **Catfishes**. Enfield: Science Publisher, 2003. p. 121-157.
- ARRATIA, G. Catfish head skeleton catfish head skeleton. An overview. In: ARRATIA, G.; KAPOOR, B.G.; CHARDON, M.; DIOGO, R. (eds.). **Catfishes**. Enfield: Science Publishers, 2003a. p. 20-46.
- AVISE, J.C. Systematic value of electrophoretic data. **Systematic Zoology**, 23:465-481, 1975.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. London: Chapman & Hall, 1994. 511p.
- BIZERRIL, C.R.S.F.; PRIMO, P.B.S. **Peixes de águas interiores do estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Femar – Semads, 2001. 417p.
- BONETTO, A.A. The Paraná river systems. In: DAVIES, B.R.; WALKER, K.F. (ed.). **The ecology of river systems**. Dordrecht, The Netherlands: Dr. W. Junk Publisher, 1986, p. 541-556.
- BRITSKI, H.A. Peixes de água doce. In: CARVALHO, J.C.M. (coord.). **Atlas da fauna brasileira**. São Paulo: Melhoramento, 1981. p. 84-93.

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

BRITTO, M. Phylogeny of the subfamily Corydoradinae Hoedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 119-154, 2003, 153p.

BURGESS, W.E. **An atlas of freshwater and marine catfishes**. A preliminar survey of the Siluriformes. New Jersey: T.F.H. Publications, 1989. 784p.

CAVALLI-MOLINA, S. **Variabilidade genética em populações naturais de Relbunium hypocarpium (Rubiaceae)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984. 231p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular).

FALCÃO, T.M.M.A.; CONTEL, E.P.B. Genetic variability in populations of brazilian social bees: III. Electrophoretic data for ME, GPD, SOD, and IDH. **Revista Brasileira de Genética**, 14:61-72, 1991.

FERRARIS JR, C.J. Catfishes and knifefishes. In: PAXTON, J.R.; ESCHMEYER, W.N.(eds.). **Encyclopedia of fishes**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 106-112.

FERRARIS JR, C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, 1418:1-628, 2007.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 220p.

FINK, S.V.; FINK, S.V. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 72:297-353, 1981.

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

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. 220p.

FRANKLIN, I.R.; FRANKHAM, R. How large must populations be to retain evolutionary potential? **Animal Conservation**, 1:69-70, 1998.

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

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

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. Amsterdam: North Holland, 1978. 670p.

HEDRICK, P.W. Conservation genetics where are we now? **Trends in Ecology & Evolution**, 16:629-636, 2001.

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

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

KELLEY, W.A.; ATZ, J.W. A pygidiid catfish that can suck blood from goldfish. **Copeia**, 4:702-704, 1964.

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

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

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

LOESCHEKE, V.; TOMIUK, J.; JAIN, S.K. Introductory remarks: genetics and conservation biology. In: LOESCHEKE, V.; TOMIUK, J.; JAIN, S.K. (eds.). **Conservation Genetics**. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1994. p. 3-8.

MACHADO, F.A.; SAZIMA, I. Comportamento alimentar do peixe hematófago *Branchioica bertonii* (Siluriformes, Trichomycteridae). **Ciência e Cultura**, 35:344-348, 1983.

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

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

MURPHY, R.W.; SITES, J.W.; BUTH, D.G.; HAUFLE, C.H. Proteins I. Isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C. (eds.). **Molecular systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1990. p. 45-126.

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

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

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

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. USA: Wiley-Interscience publication, 1984. 523p.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. New York: John Willey and Sons, 1994. 600p.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley and Sons, 2006. 550p.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA TOLEDO, L.F.; MORI, L.; TOLEDO FILHO, S.A. Extensive chromosomal rearrangements and nucleolar DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Journal of Fish Biology**, 40:419-431, 1992.

PAIVA, S. **Variabilidade genética em populações de *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) do rio Ivaí, bacia do Alto Rio Paraná, Brasil**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 45p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

PAIVA, S.; RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H. Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 28:370-375, 2005.

PERES, M.D.; RENESTO, E.; LAPENTA, A.S.; ZAWADZKI, C.H. Genetic variability in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes: Erythrinidae) in fluvial and lacustrine environments in the upper Paraná River floodplain (Paraná state, Brazil). **Biochemical Genetics**, 40:209-223, 2002.

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

PINNA, M.C.C. Phylogenetic relationships of neotropical siluriformes (Teleostei, Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: MALABARBA, R.E.; REIS, R.P.; VARI, Z.M.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p. 279-330.

PRAKASH, S.; LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations IV. patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, 61:841-858, 1969.

REIS, C.A.F. **Diversidade genética de plântulas, árvores jovens e adultas de *Calophyllum brasiliense* Camb. em uma floresta paludosa**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 68p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal).

REIS, R.E. Revision of the neotropical catfish genus *Hoplosternum* (Ostariophysi, Siluriformes, Callichthyidae), with the description of two new genera. **Ichthyological Exploration**, 7:299-326, 1997.

REIS, R.E. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 124:105-168, 1998.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. **Check list of the freshwater fish of south America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 729p.

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

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

REUSING, A.F. **Variabilidade genética em *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) de duas localidades da bacia do rio Paranapanema, Brasil**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 54p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

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

RICHARDSON, B.J.; BAVERSTOCK, P.R.; ADAMS, M. **Allozyme electrophoresis**. A handbook for animal Systematics and populations studies. North Ride: Academic Press, 1986. 410p.

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

SHIMABUKURO-DIAS, C.K.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic studies in species of the subfamily Callichthyinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae). **Caryologia**, 1:102-111, 2005.

SHIMABUKURO-DIAS, C.K.; OLIVEIRA, C.; REIS, R.E.; FORESTI, F. Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 32:152-63, 2004.

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

SHIELDS, C.R.; ORTON, T.J.; STUBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: TANSKLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 443-468.

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

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 172-192.

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

SOULÉ, M.E. Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In: SOULÉ, M.E.; WILCOX, B.A. (eds.). **Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 1980. p. 111-124.

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

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

UTTER, F. Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. **Journal of Fish Biology**, 39:1-20, 1991.

VENDEL, A.L.; ROSA, I.L.; FARIAS, R.C.A.P.; CASTRO, A.L.C. **Banco de sêmen de peixes do Pantanal**. Disponível em: <http://www.sbi.bio.br/boletins/boletim79.pdf>. Acesso em: 10, março, 2011.

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

VRIJENHOEK, R.C. Conservation genetics of freshwater fishes. **Journal of Fish Biology**, 53:394–412, 1998.

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

WEITZMAN, S.H.; MENEZES, N.A.; WEITZMAN, M.J. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. **Academia Brasileira de Ciências**, 1:379-427, 1988.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. **Popgene version 1.31**. Microsoft window based freeware for population genetic analysis. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

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

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

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

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

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