

VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS

RESPONSÁVEIS: ALBERTO JOSÉ PRIOLI, ERASMO RENESTO E HORÁCIO FERREIRA JÚLIO JR (COORDENADORES); SÔNIA MARIA ALVES PINTO PRIOLI, CARLA SIMONE PAVANELLI, MARIA CONCEIÇÃO DE SOUZA (PESQUISADORAS); ALESSANDRA VALÉRIA DE OLIVEIRA, LAURA LEAL DE CASTRO, MARIA DOLORES PERES MORALES E ELIZABETE SATSUKI SEKINE (PÓS-GRADUANDAS); RENATA DE SOUZA PANARARI, JOSIANE CRISTINA GALDINO, THIAGO CINTRA MANIGLIA (BOLSISTAS IC)

Resumo

As atividades desenvolvidas neste sub-projeto envolveram estudos de diversidade e estrutura genética de populações naturais de peixes. Além desses aspectos foram avaliados os fluxos gênicos e diferenciação genética entre populações de peixes em diferentes ambientes. O objetivo básico destes estudos foi analisar o impacto genético da mistura de populações do médio e alto rio Paraná decorrente do alagamento dos saltos de Sete Quedas pelo reservatório de Itaipu. Um estudo acerca da propagação vegetativa de uma importante espécie vegetal da mata ripária é também relatado.

Diversidade e distância genética em populações do gênero *Steindachnerina*

Introdução

O gênero *Steindachnerina*, família Curimatidae, ordem Characiformes, é constituído por espécies de pequeno porte, iliófagas, que ocorrem nos sistemas de drenagem que correm através de grandes planícies da América do Sul Subtemperada e Tropical. Das mais de 20 espécies do gênero, 4 ocorrem na bacia do Rio Paraná, sendo que *S. insculpta* é a espécie endêmica da bacia do Rio Paraná Superior, ocorrendo como única do gênero no terço inferior do Alto Rio Paraná, onde está localizada a área de estudo do curso de

Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais da Universidade Estadual de Maringá. A espécie é identificada, entre outras características, por ausência de mácula na porção basal da nadadeira dorsal.

Nos últimos anos, nas coletas realizadas pelo NUPELIA (Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura) da Universidade Estadual de Maringá, entre os exemplares de *Steindachnerina insculpta* começaram a aparecer indivíduos com presença de mancha escura bem evidente na nadadeira dorsal e indivíduos com mácula pouco evidente. A construção do reservatório de Itaipu eliminou os Saltos de Sete Quedas, na região de Guaíra-PR que representava uma barreira natural à dispersão de peixes. Em virtude de um segmento

do Médio Rio Paraná passar a ter continuidade com o Alto Rio Paraná, populações de *Steindachnerina* que antes estariam geograficamente isoladas poderiam estar formando híbridos e iniciando um processo de homogeneização genética na região. Com o objetivo de analisar a variabilidade genética das populações de *Steindachnerina* através de técnicas moleculares, será possível testar a hipótese citada anteriormente e o trabalho poderá subsidiar outros estudos, inclusive de cunho ecológico com respeito às perturbações que podem ser causadas pela introdução de uma nova população no local.

Desenvolvimento

Foram coletados, nos meses de maio e agosto de 2000, exemplares de *Steindachnerina* em vários pontos da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná, incluindo lagoas (Lagoa Clara, Genipapo, do Osmar e Maria Luiza), rещacos (Rещaco do Pau Véio) e Rio Paraná. Os espécimes foram coletados com rede de espera e redes de arrasto e foram escolhidos ao acaso 20 indivíduos com mácula, 20 com mácula intermediária e 20 sem mácula para as análises genéticas. Os peixes foram fixados em álcool etílico comercial e estocados em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A metodologia utilizada para extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio. Amostras de tecido muscular de $\pm 0,5\text{ cm}^2$ foram retiradas de cada peixe, maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em $500\text{ }\mu\text{l}$ de tampão PS (Tris-HCl $0,2\text{ M}$, EDTA 30 mM , SDS 2% e Sacarose 5%), $500\text{ }\mu\text{l}$ de tampão TH (Tris-HCl 10 mM , NaCl 60 mM , EDTA 10 mM , Sacarose 5% , Espermina $0,15\text{ mM}$ e Espermidina $0,15\text{ mM}$) pH $8,0$ e $5\text{ }\mu\text{l}$ de proteinase K ($20\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$) por 2 horas em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida o DNA foi purificado por extração com $500\text{ }\mu\text{l}$ de fenol/clorofórmio (1:1) e $500\text{ }\mu\text{l}$ clorofórmio, respectivamente e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado. O pellet obtido foi ressuscitado em $50\text{ }\mu\text{l}$ de

tampão TE (Tris 10 mM , EDTA 1 mM) com RNase e submetido à banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada através de eletroforese em gel de agarose $0,8\%$, corado com brometo de etídio, por meio de comparação com DNA de fago λ de concentração conhecida.

A técnica RAPD está sendo utilizada para a comparação das amostras dos diferentes espécimes de *Steindachnerina* e foi realizado um teste para a seleção dos oligonucleotídeos que serão utilizados nesse estudo, com primers provenientes dos kits OPA, OPW, OPX e OPE (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA). As condições de amplificação foram baseadas em metodologia descrita por Bardacki e Skibinski. Aproximadamente $7\text{ }\mu\text{l}$ do produto de amplificação foi aplicado e separado em gel de agarose $1,4\%$ corado com brometo de etídio. A visualização dos fragmentos foi feita sob radiação ultravioleta. De um total de 100 primers testados, 19 foram selecionados, com base no padrão de bandas que produziram. São eles: W3, W4, W6, W9, W15, W17, W19, X1, X4, X5, X18, X20, A6, A7, A12, A15, E8, E9 e E13.

Considerações finais

Amostras de DNA de 4 indivíduos foram testadas com cada primer, sendo que uma amostra era proveniente de indivíduo sem mácula, uma amostra de indivíduo com mácula intermediária e duas amostras de indivíduos com mácula. Com base nos perfis eletroforéticos produzidos por cada primer em cada indivíduo, há indicações preliminares de que as populações com mácula e sem mácula apresentam divergência genética suficiente para caracterizá-las como espécies diferentes, visto que o padrão de bandas dos indivíduos dessas respectivas populações é diferenciado (Figura 1) com alterações no número e tamanho de fragmentos produzidos.

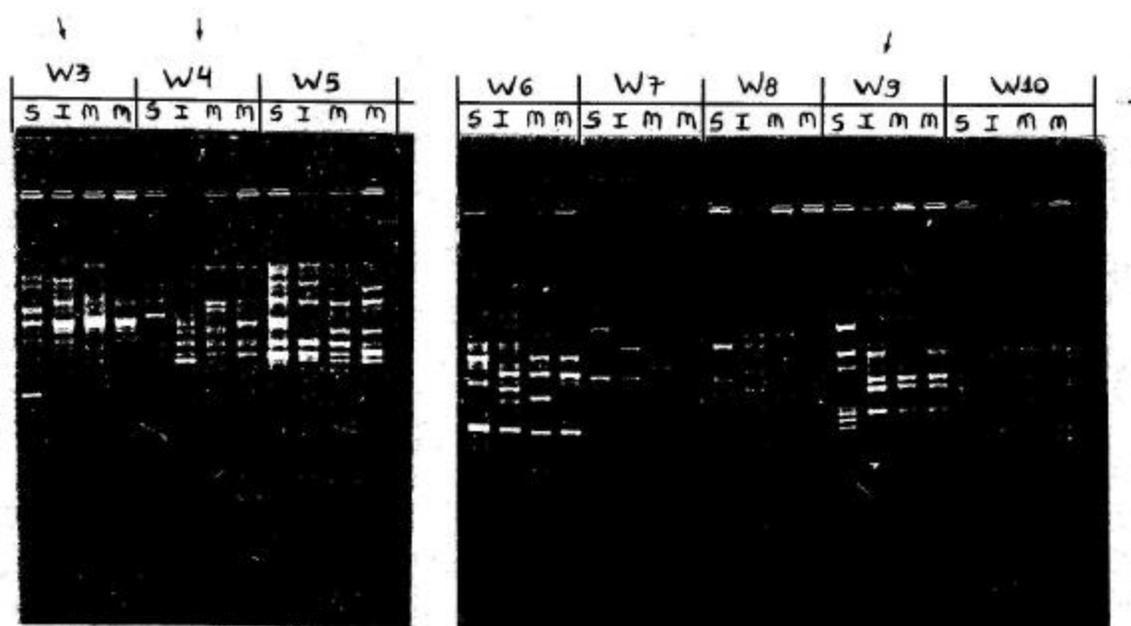


Figura 1: S= indivíduo sem mácula; I= indivíduo com mácula intermediária; M= indivíduo com mácula

Variabilidade genética em populações de *Gymnotus*

Introdução

O gênero *Gymnotus* possui ampla distribuição geográfica e *G. carapo* é a espécie tipo. Pela grande semelhança morfológica entre as espécies deste gênero, muitas vezes ocorrem identificações equivocadas de espécies que acabam sendo denominadas como *G. carapo*, sem na verdade sê-la. Na planície de inundação do alto rio Paraná foram encontrados espécimens com citótipos diferentes ($2n = 40$ e $2n = 54$) (Borin & Júlio Jr., 1994) o que sugere a existência de mais de uma espécie.

As espécies deste gênero habitam geralmente ambientes lânticos, de águas escuras e fundo lodoso, com presença de raízes, folhas e pedras (Barbieri, 1981; Fernandes-Matioli, 1999). Na planície de inundação está presente em lagoas e em alguns canais, como o Corutuba, e nos rios Baía e Iguatemi, sendo raramente encontrado na calha do rio Paraná (Borin & Júlio Jr., 1994; Agostinho & Júlio Jr., 1999).

Outra característica do *Gymnotus* é ser um peixe não migrador, o que segundo Ryman & Utter (1987) levaria a deduzir que existe maior diferença genética entre as populações dessa bacia do que entre populações de bacias diferentes. O desenvolvimento de métodos genético-bioquímicos e genético-moleculares, proporcionam a possibilidade de avaliar a

variabilidade genética dentro e entre as populações da planície.

O estudo da variabilidade genética de *Gymnotus* no alto rio Paraná, possibilitaria compreender a importância dos pulsos de inundação no fluxo gênico das espécies, sabendo assim se as cheias homogeneizariam as populações de *Gymnotus* existentes nas lagoas da planície. Entretanto para isso se faz necessário também a identificação das espécies existentes para que os valores de variabilidade tenham coerência.

A despeito do fato desse gênero não ser migrador, os pulsos de inundação, que transformavam a planície praticamente em um só corpo d'água, permite levantar a hipótese de que as subpopulações da área têm alto índice de homogeneidade.

Objetivos

Avaliar a variabilidade genética de *Gymnotus* (morenita) na planície de inundação do alto rio Paraná, através da técnica de RAPD e SPAR.

Objetivos específicos

(a) Obter indicações de que o pulso de inundação da planície agia com elemento homogeneizador das populações de *Gymnotus* das lagoas da planície.

(b) Verificar se os espécimens das diferentes lagoas constituem populações distintas umas das outras.

(c) Identificar marcadores moleculares para as espécies existentes na planície de inundação do alto rio Paraná.

Materiais e métodos

As coletas foram realizadas em três lagoas da planície de inundação do alto rio Paraná: Lagoa do Pernambuco - Rio Paraná, Lagoa dos Patos - Rio Ivinheima, e Lagoa do Pernambucano - Rio Baía. Foram coletados no mínimo 15 indivíduos de cada população. Amostras de músculo foram

coletadas de cada espécimen, fixadas em etanol e estocadas em freezer -20 °C

A extração do DNA total, foi feita de acordo com a proposta de Whitmore *et al.* (1992). Fragmentos de tecido muscular preservados em etanol absoluto foram homogeneizados em tubo eppendorf contendo 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA, 0,1% de SDS, 50 mM de ditioneitol (DTT) e proteinase K (2,5 µg/mL) por 24 horas em banho-maria a 42 °C. O DNA foi purificado com uma extração de fenol/Tris pH 8,0 e duas de clorofórmio/isoamílico (24:1). O DNA obtido foi precipitado com etanol 100% e ressuspendido em tampão TE. A estimativa da quantidade de DNA presente em cada amostra foi feita através da comparação com o DNA do fago λ de concentração conhecida, por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A amplificação do DNA foi baseada nas condições propostas por Bardakci e Skibinski (1994). O *primer* provenientes do *kit* OPX (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) foi testados para a seleção dos oligonucleotídeos que serão utilizados neste trabalho. As amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1,4% e coradas com brometo de etídio para a visualização e comparação dos fragmentos amplificados

A técnica conhecida como SPAR (*single primers amplifications reactions*) gera marcadores moleculares efetivos em plantas e animais (Gupta *et al.*, 1994). A amplificação é realizada via PCR e a peculiaridade da técnica é o emprego de um único *primer* com a seqüência repetitiva de um microssatélite. As amostras de DNA foram amplificadas com o *primer* MICRO 11, nas condições propostas por Fernandes-Matioli (1999) e os padrões de bandas obtidos foram comparado com os apresentados por essa autora.

Estão sendo testados e selecionados os *primers* do *kit* OPA. As amostras dos diferentes locais de coleta serão comparadas pela técnica de RAPD.

Resultados preliminares

Foram coletados um total de 83 indivíduos, sendo 29 do sistema Baía, 29 do sistema Paraná e 25 do sistema Ivinheima. O DNA de 63 espécimens foi extraído, quantificado e posteriormente diluído para uso nas ampliações que ainda estão em andamento.

Quatro *primers* para RAPD do *kit* OPX foram selecionados e utilizados para a amplificação de onze indivíduos. Outros 63 indivíduos também foram analisados pela metodologia SPAR, utilizando o *primer* Micro11 e identificadas ao nível de espécies através dos padrões de bandas obtidos.

O polimorfismo revelado pelos *primers* RAPD permite separar os indivíduos coletados em dois grupos distintos, que compartilham poucos alelos dominantes nos locos detectados. Esta diferenciação das populações é uma indicação preliminar de que na planície de inundação do alto rio Paraná ocorrem pelo menos duas espécies do gênero *Gymnotus*.

Os padrões de bandas obtidos com o *primer* micro11 foram comparados com os padrões específicos apresentados por Fernandes-Matioli (1999). Os padrões polimórficos detectados sugerem a ocorrência de duas espécies de *Gymnotus*, corroborando as informações geradas com marcadores RAPD.

Distância genética e fluxo gênico entre populações de pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces-Siluriformes) isoladas pelos saltos de Sete Quedas, Rio Paraná

Introdução

A construção de reservatórios para geração de energia elétrica causa modificações no padrão de dispersão de várias espécies de peixes migratórios pela eliminação de barreiras

geográficas naturais (Agostinho *et al.*, 1992). Além disso, constituem-se em novas barreiras, impedindo a migração de peixes e, dependendo das condições, podem levar à extinção de espécies menos aptas a suportar esse tipo de alteração (Godinho e Godinho, 1994).

Os Saltos de Sete Quedas separavam o alto e o médio rio Paraná e eram considerados uma barreira geográfica que separava duas províncias ictiofaunísticas distintas (Bonetto, 1986). Após a inundação pela formação do lago de Itaipu, em 1982, essa barreira foi deslocada 150 km a jusante. O trecho anteriormente localizado entre Sete Quedas e a barragem de Itaipu passou a ter continuidade com o alto rio Paraná. Como consequência, pelo menos 17 espécies que habitavam o médio rio Paraná, abaixo de Sete Quedas colonizaram o alto rio Paraná (Agostinho *et al.*, 1994).

É possível que Sete Quedas não representasse uma barreira absolutamente intransponível para a migração de peixes. Agostinho *et al.* (1997) ressaltaram que em períodos de cheias excepcionais algumas espécies seriam capazes de superá-la. Espécies ágeis como curimba, dourado e piapara talvez pudessem transpô-la em situações em que o desnível diminuísse sensivelmente. No entanto, mesmo nessas ocasiões, seria pouco provável que espécies de Siluriformes, como o pintado, pudessem subir as Sete Quedas (Júlio Jr, comunicação pessoal). A dificuldade de Siluriformes em transpor barreiras foi constatada por Godinho *et al.* (1991) em escada situada na barragem da UHE Salto do Morais, rio Tijuco, da bacia do Rio Paraná, no Estado de Minas Gerais. Mesmo que se considere que os Saltos de Sete Quedas impedissem qualquer subida de Siluriformes, existiria ainda a possibilidade de migração unidirecional e mistura de populações pela descida nos Saltos de Sete Quedas, de adultos, ovos e larvas.

A existência de barreiras geográficas isola populações de peixes, podendo gerar polimorfismos intraespecíficos e divergências

genéticas entre populações ao longo do tempo. A alteração ou remoção destas barreiras poderia iniciar ou intensificar o fluxo gênico entre populações. Situações como estas permitem análises da variabilidade genética e inferência sobre fluxo gênico e divergência genética entre populações.

Um método rápido e eficiente para se conduzir estudos de análise genética de populações é o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), proposto por Williams *et al.* (1990). Numerosos trabalhos têm confirmado que esta metodologia é eficiente na detecção de variação genética em espécies e populações de diversos organismos, inclusive em peixes (Bielawski e Pumo, 1997; Caccone *et al.*, 1997; Callejas e Ochando, 1998; Elo *et al.*, 1997; Jayasankar e Dharmalingan, 1997; Kuusipalo, 1999; Liu *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1998).

A espécie *Pseudoplatystoma corruscans*, objeto deste estudo, popularmente conhecida com pintado ou surubim, é uma espécie migratória de grande interesse comercial, amplamente distribuída na bacia do rio Paraná (Marques, 1993). Dadas as circunstâncias criadas com a barragem de Itaipu, as populações desta espécie estariam sujeitas a alterações significativas no fluxo gênico entre elas. Portanto, é plausível a hipótese de que mesmo que as populações acima e abaixo de Sete Quedas fossem geneticamente diferenciadas, atualmente a população do lago e a população da planície estariam diminuindo a divergência genética e aproximando-se da homogeneidade.

Neste trabalho foi avaliada, com a técnica de RAPD, a diferenciação genética de populações de *P. corruscans* do médio e alto curso do rio Paraná, anteriormente separadas pelos Saltos de Sete Quedas.

Materiais e métodos

Coleta e processamento das amostras

Foram estudadas as populações de *P. corruscans* de três regiões do rio Paraná, as

quais teriam sido influenciadas pelos Saltos de Sete Quedas antes do fechamento da barragem da usina hidroelétrica de Itaipu. Como representante do alto rio Paraná foi amostrada a população da planície de inundação na região de Porto Rico, PR, a aproximadamente 200 km da posição de Sete Quedas. Do médio rio Paraná foi estudada a população a jusante da barragem de Yacyreta – Paraguai/Argentina. Antes da construção das barragens de Itaipu e Yacyreta, os indivíduos dessa população podiam se deslocar até Sete Quedas. Também foram amostrados indivíduos da porção superior do reservatório de Itaipu, que representaria o trecho do médio rio Paraná que passou a ter continuidade com o alto rio Paraná (Figura 1).

Fragmentos de nadadeira adiposa ou tecido muscular de 12 espécimes de cada localidade foram coletadas entre março de 1998 e maio de 2000. Oito das doze amostras do reservatório de Itaipu foram de tecido muscular, sendo as amostras das demais localidades compostas somente de nadadeiras adiposas. As coletas da planície de inundação foram realizadas diretamente dos espécimes vivos e nas demais localidades foram obtidas em peixarias locais ou diretamente dos pescadores. Os fragmentos de nadadeira adiposa e tecido muscular foram preservados em álcool etílico comercial (97%) e posteriormente estocados em freezer (-20 °C).

Para a extração de DNA genômico total, foi utilizada a metodologia proposta por Whitmore *et al.* (1992), com algumas modificações. Fragmentos de aproximadamente 30 mg de nadadeira adiposa ou tecido muscular preservados em etanol foram colocados em tubo eppendorf contendo 500 µL de tampão (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,1% SDS, 50 mM ditiotreitol e 50 µg proteinase K) por aproximadamente 24 horas em banho-maria a 42 °C. Em seguida, o DNA foi purificado com uma extração de fenol/Tris pH 8,0 e duas de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O DNA obtido foi precipitado com etanol 100% e ressuspendido em aproximadamente 30 µL de

tampão 1/10 TE (1 mM Tris pH 8,0; 0,1 mM EDTA) + RNase (20 µg/mL). A suspensão foi

então incubada em banho-maria a 37 °C por 1 hora para a digestão do RNA.

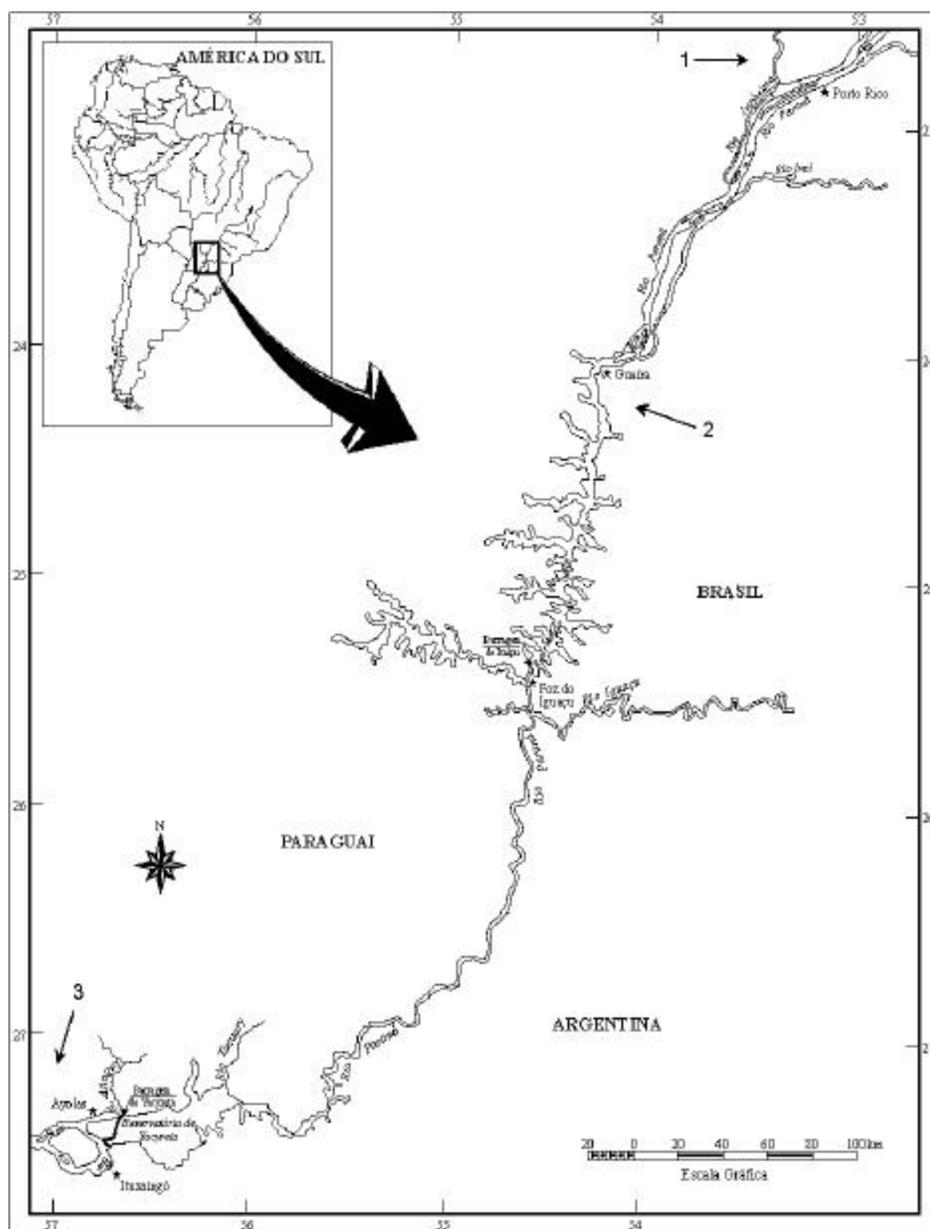


Figura 1. Localização das áreas de coleta no rio Paraná: planície de inundação do alto rio Paraná (1), porção superior do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu (2), jusante da barragem da usina hidrelétrica de Yacyretá (3).

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 %. Com base nestas estimativas, as amostras foram diluídas para a concentração de 5 ng/ μ L e novamente quantificadas para diminuir a possibilidade de erro.

As amostras de DNA das diferentes populações foram comparadas pela técnica de RAPD. A amplificação foi feita em uma mistura de reação com um volume total de 13 μ L, contendo 10 ng DNA, 0,46 μ M de cada *primer*, 1 U Taq-DNApolimerase, 200 μ M de cada dNTP, 2 mM MgCl₂ e tampão (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl).

As condições de amplificação do DNA foram baseadas em Almeida (1998), em termociclador programado para uma etapa inicial de 4 min a 92 °C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 92 °C, 1 min 30 seg a 40 °C e 2 min a 72 °C, e uma etapa final de 5 min a 72 °C. Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram selecionados dos *kits* OPA, OPX e OPW (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA). Para a seleção dos *primers*, o DNA de um indivíduo foi utilizado para a amplificação de todos os *primers* dos três *kits* utilizados. Após a amplificação, foram escolhidos os oligonucleotídeos que produziram maior quantidade de bandas.

As amostras amplificadas para a comparação das populações foram aplicadas em gel de agarose 1,4 % contendo brometo de etídeo (0,02 %) em cuba contendo tampão TBE (Tris-borato-EDTA) e submetidas a um campo elétrico de 80 V. Após uma corrida de aproximadamente 10 cm, o géis foram fotografados para análise posterior. Os tamanhos, em pares de bases, das sequências de DNA amplificadas foram estimados por comparação com um padrão (Ladder 100 pb, Gibco BRL).

Análise dos dados

As comparações foram realizadas a partir do conhecimento da presença (1) ou ausência (0) de fragmentos RAPD para cada indivíduo. Para as análises, foram utilizados os locos polimórficos ao nível de 5% (Strickberger, 1985). Para testar diferenças significativas nas frequências dos marcadores em diferentes populações foi utilizado o teste G (Sokal e Rohlf, 1969). O teste exato de Fisher foi utilizado para detectar diferenças entre as populações, considerando-se todos os locos simultaneamente (Raymond e Rousset, 1995).

A estatística F'_{ST} de Lynch (1991) e Lynch e Milligan (1994), análoga à estatística F_{ST} de Wright foi utilizada para calcular o fluxo gênico (Nm) entre as populações. A distância genética D'_{ij} foi calculada conforme Lynch (1991). Esta distância é análoga à distância não enviesada de Nei.

Resultados

Foram testados sessenta *primers* dos *kits* OPA, OPX e OPW. Destes, dezenove foram selecionados com base no número e na nitidez das bandas produzidas. Conforme consta na Tabela 1, o número de fragmentos gerados por *primer* variou de 5 a 14 e o tamanho dos fragmentos variou de 400 a 2540 pb. Dos *primers* selecionados, seis amplificaram somente locos monomórficos (32 locos), e os treze restantes amplificaram 120 locos, totalizando 152. Destes, 27% (41 locos) foram considerados polimórficos ao nível de 5%.

Não foram observadas diferenças na qualidade dos fragmentos amplificados entre amostras coletadas de espécimes vivos e de peixarias. Houve um alto grau de uniformidade dos locos amplificados entre todas as amostras coletadas, como mostrado na Figura 2, que ilustra o resultado de amplificação pela técnica de RAPD com o *primer* OPA-10.

Os resultados do teste G para estes locos estão listados na Tabela 2. Apenas dois locos

(OPW-5₈₃₀ e OPW-9₁₃₁₀) mostraram diferenças interpopulacionais significativas. A população da região a montante de Itaipu e a jusante de Yacyreta não apresentaram diferenças significativas em nenhum loco. Estes resultados indicam baixa diferenciação entre as três

populações estudadas. Do mesmo modo, pelo teste exato de Fisher (Tabela 3), considerando-se todos os locos simultaneamente, as populações também não mostraram diferenças significativas.

Tabela 1 – *Primers* RAPD selecionados dos kits Operon A, X e W para a comparação de populações do Pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* do rio Paraná

<i>PRIMERS</i>	SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS (5' @ 3')	Nº DE LOCOS DETECTADOS	Nº DE LOCOS POLIMÓRFICOS A 5%	TAMANHO DOS FRAGMENTOS (PB)
OPA-01	CAGGCCCTTC	13	2	620 – 2090
OPA-10	GTGATCGCAG	07	3	430 – 1220
OPA-11	CAATCGCCGT	07	4	550 – 1700
OPA-12*	TCGGCGATAG	05	0	670 – 2180
OPA-16	AGCCAGCGAA	14	7	600 – 2340
OPX-05*	CCTTTCCTC	06	0	1000 – 1800
OPX-07*	GAGCGAGGCT	05	0	800 – 1900
OPX-09*	GGTCTGGTTG	05	0	400 – 1200
OPX-17	GACACGGACC	06	1	630 – 1620
OPW-03	GTCCGGAGTG	06	5	470 – 1580
OPW-05	GGCGGATAAG	10	4	570 – 1640
OPW-06	AGGCCCGATG	13	3	410 – 2320
OPW-08*	GACTGCCTCT	05	0	400 – 1780
OPW-09	GTGACCGAGT	14	6	690 – 2160
OPW-10	TCGCATCCCT	06	3	880 – 1690
OPW-11	CTGATGCGTG	12	1	590 – 2540
OPW-15*	ACACCGGAAC	06	0	550 – 1900
OPW-17	GTCCTGGGTT	05	1	690 – 1930
OPW-19	CAAAGCGCTC	07	1	500 – 2260
TOTAL		152	41	

* *Primers* que amplificaram somente locos monomórficos

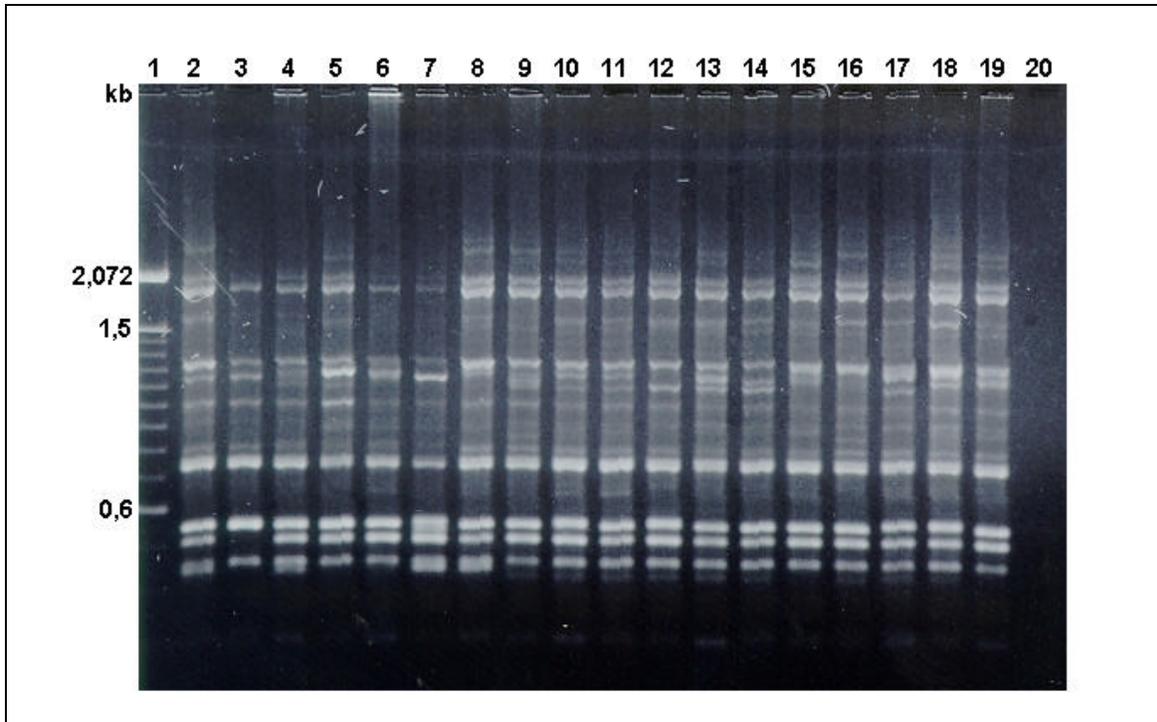


Figura 2. Fragmentos de DNA de *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) do rio Paraná amplificados com o *primer* OPA-10. (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb, Gibco BRL; (2 a 13) amostras da planície de inundação do alto rio Paraná; (14 a 19) amostras do reservatório de Itaipu; (20) branco.

Os resultados do teste G para estes locos estão listados na Tabela 2. Apenas dois locos (OPW-5₈₃₀ e OPW-9₁₃₁₀) mostraram diferenças interpopulacionais significativas.

A população da região a montante de Itaipu e a jusante de Yacyreta não apresentaram diferenças significativas em nenhum loco. Estes resultados indicam baixa diferenciação entre as três populações estudadas.

Do mesmo modo, pelo teste exato de Fisher (Tabela 3), considerando-se todos os locos

simultaneamente, as populações também não mostraram diferenças significativas. De acordo com os resultados da análise espacial, observamos que as maiores ocorrências de ovos para a superfície foram obtidas nos pontos P02, com 28,73 ovos/10m³, P05, com 4,26 ovos/10m³ e P09, com 4,05 ovos/10m³ (Fig. 3A). Já para as coletas de fundo as capturas mais relevantes foram registradas nos pontos P02, com 11,52 ovos/10m³, PP03 com 9,29, e P09, com 7,76 ovos/10m³ (Fig. 3B).

Tabela 2. Resultados do teste G para heterogeneidade nas frequências de marcadores RAPD entre amostras do Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) coletadas na planície de inundação do alto rio Paraná (PL), na região a montante da barragem da usina hidrelétrica de Itaipu (IT), na região a jusante da barragem da usina hidrelétrica de Yacyreta (YA)

Loco	PL x IT		PL x YA		IT x YA		PL x IT x YA	
	G	P (GL=1)						
OPA-10 ₁₁₀₀	1.085	>0.05	0.521	>0.05	0.104	>0.05	1.145	>0.05
OPA-11 ₁₇₀₀	0.954	>0.05	0.099	>0.05	0.441	>0.05	1.003	>0.05
OPA-11 ₁₅₈₀	0.379	>0.05	0.0	>0.05	0.379	>0.05	0.501	>0.05
OPA-16 ₂₃₄₀	0.016	>0.05	0.441	>0.05	0.276	>0.05	0.491	>0.05
OPA-16 ₁₄₃₀	0.840	>0.05	0.101	>0.05	0.375	>0.05	0.852	>0.05
OPA-16 ₁₂₈₀	1.315	>0.05	0.145	>0.05	2.280	>0.05	2.421	>0.05
OPA-16 ₈₂₀	0.295	>0.05	0.0	>0.05	0.295	>0.05	0.381	>0.05
OPA-16 ₆₈₀	0.020	>0.05	0.101	>0.05	0.203	>0.05	0.213	>0.05
OPX-17 ₈₁₀	0.521	>0.05	0.904	>0.05	2.750	>0.05	2.755	>0.05
OPW-03 ₁₃₁₀	0.230	>0.05	0.229	>0.05	0.954	>0.05	0.954	>0.05
OPW-05 ₁₆₄₀	0.954	>0.05	1.658	>0.05	0.101	>0.05	1.839	>0.05
OPW-05 ₈₅₀	0.441	>0.05	0.953	>0.05	0.099	>0.05	1.003	>0.05
OPW-05 ₈₃₀	5.389	*<0.05	8.062	*<0.01	0.379	>0.05	8.375	*<0.05
OPW-05 ₇₄₀	0.405	>0.05	0.117	>0.05	0.954	>0.05	0.976	>0.05
OPW-06 ₁₇₇₀	2.985	>0.05	1.368	>0.05	0.498	>0.05	3.208	>0.05
OPW-09 ₁₃₁₀	5.635	*<0.05	8.062	*<0.01	0.200	>0.05	8.535	*<0.05
OPW-10 ₉₉₀	0.877	>0.05	1.368	>0.05	0.044	>0.05	1.546	>0.05
OPW-10 ₈₈₀	1.228	>0.05	2.585	>0.05	0.230	>0.05	2.666	>0.05
OPW-19 ₁₇₉₀	0.044	>0.05	3.139	>0.05	2.340	>0.05	3.700	>0.05
Teste exato de Fisher	$\chi^2=26.50$	>0.05	$\chi^2=24.13$	>0.05	$\chi^2=22.05$	>0.05	$\chi^2=33.21$	>0.05

Obs.: Os números ao lado dos locos representam o tamanho, em pares de bases, dos fragmentos amplificados.

Os valores de F'_{ST} , utilizando a estatística de Lynch (1991) e Lynch e Milligan (1994), foram baixos entre as populações do rio Paraná (Tabela 3), variando de 0,030 a 0,112, sendo que o menor valor correspondeu às populações do reservatório de Itaipu e à população coletada a jusante da usina de Yacyreta, e o maior valor foi encontrado entre a população da planície de inundação do alto rio Paraná e a região a jusante de Yacyreta. O fluxo gênico foi também maior

entre as populações do reservatório de Itaipu e de jusante de Yacyreta, com número médio de migrantes $Nm = 8,1$.

Conforme consta na Tabela 4, a distância genética foi menor entre a população do reservatório de Itaipu e a população da região situada a jusante da barragem de Yacyreta ($D = 0,0298$) e maior entre a planície de inundação e a região a jusante da barragem ($D = 0,1120$).

Tabela 3. Estimativa do índice de fixação de populações (F_{ST}) do Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) do rio Paraná e número médio de migrantes por geração (N_m). PL= planície de inundação do alto rio Paraná; IT= região a montante da barragem da usina hidroelétrica de Itaipu; YA= região a jusante da barragem da usina hidroelétrica de Yacyreta.

	F_{ST}	N_m
PL – YA	0.112 (0.128)	2,0
PL – IT	0.090 (0.127)	2,5
IT – YA	0,030 (0.074)	8,1

Os números entre parênteses representam o desvio padrão.

Tabela 4. Distância genética de Lynch entre populações do Pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*. PL= planície de inundação do alto rio Paraná; IT= região a montante da barragem da usina hidroelétrica de Itaipu; YA= região a jusante da barragem da usina hidroelétrica de Yacyreta.

POPULAÇÕES	DISTÂNCIA GENÉTICA DE LYNCH		
	PL	IT	YA
PL	0,0000		
IT	0,0898	0,0000	
YA	0,1120	0,0298	0,0000

Discussão

Os resultados foram, de modo geral, concordantes em indicar baixa divergência genética entre as três populações de *P. corruscans* estudadas. No entanto, algumas estimativas obtidas parecem indicar que persistem diferenças entre as populações. São diferenças de pequena magnitude, mas que refletiriam a existência, pelo menos em baixo nível, de heterogeneidade genética interpopulacional.

Os testes de contingência e exato de Fisher não detectaram diferenciação significativa entre

quaisquer combinações das populações. Da mesma forma, as estimativas de F_{ST} não evidenciaram diferenciação entre as populações por deriva genética. Apesar de baixas, as estimativas de F_{ST} foram mais elevadas entre a população da planície e as populações de Itaipu e Yacyreta. As estimativas de N_m , o equivalente ao número de migrantes por geração, foram relativamente altas, com o mínimo de 2,0 entre as populações da planície e de Yacyreta. Os resultados de N_m seguiram um padrão inverso aos encontrados para F_{ST} , como seria esperado, uma vez que N_m é um parâmetro genético-populacional derivado de

F[']ST. Valores de Nm acima de 1 indicam que o fluxo gênico é um fator atuante contra a diferenciação genética entre as populações (Strickberger, 1985).

Estes resultados sugerem que as populações de *P. corruscans* das regiões da planície de inundação, Itaipu e Yacyreta estariam, de fato, conectadas por fluxo gênico no período anterior à construção das duas barragens. A intensidade do fluxo gênico teria sido de tal ordem que restringiu a diferenciação das populações em níveis não detectáveis, ainda hoje, pelos testes de significância.

Por outro lado, as distâncias genéticas, estimadas pela metodologia de Lynch, mostram diferenças genéticas expressivas entre a população da planície e as populações de Itaipu ($D' = 0,0899$) e Yacyreta ($D' = 0,1120$). Nesta espécie, já foi constatado que mesmo entre populações geograficamente muito distantes, como a população da planície e da população dos rios Cuiabá/Manso, a estimativa de distância genética é de magnitude semelhante (Sekine et al., 2000). Assim, o distanciamento encontrado suporta a interpretação de que, embora em níveis baixos, há diversidade genética entre as populações de pintado do médio e alto rio Paraná.

Portanto, o conjunto de resultados obtidos fornece indicações suficientes para sustentar a conclusão de que os Saltos de Sete Quedas constituíam uma barreira que promovia, ao menos parcialmente, o isolamento reprodutivo entre as populações de pintado residentes a montante e a jusante. O obstáculo oferecido por Sete Quedas não seria absoluto, pois entre as populações da planície e Yacyreta foi detectado fluxo gênico equivalente a dois migrantes por geração. Há que se considerar, todavia, que este número de migrantes poderia representar uma superestimativa em relação ao que seria encontrado antes do fechamento da barragem de Itaipu e o conseqüente contato entre as populações. Os indivíduos do médio rio Paraná que ficaram na região inundada representavam

uma amostra da população a jusante. Qualquer nível de intercâmbio genético entre os indivíduos retidos no represamento e a população da planície teria como efeito o aumento do Nm estimado entre a planície e Yacyreta.

Deve ser ressaltado que todos os parâmetros populacionais estimados evidenciaram que a população de Itaipu situa-se geneticamente mais próxima da população de Yacyreta. O índice F[']ST entre as populações Itaipu e Yacyreta foi três vezes menor do que entre a planície e Itaipu. Em consonância com estes resultados, o fluxo gênico estimado entre Itaipu e Yacyreta também foi aproximadamente três vezes maior do que o estimado para a planície e Itaipu. Finalmente, com a distância de Lynch foi encontrado o mesmo padrão, com a estimativa $D' = 0,0899$ entre a população da planície cerca de três vezes maior do que a distância $D' = 0,0298$ entre Itaipu e Yacyreta.

Uma interpretação plausível para o maior distanciamento entre as populações da planície e Itaipu em relação à combinação Itaipu e Yacyreta, seria a existência nesta espécie, ao menos de forma parcial, de comportamento migratório de retorno ao local de nascimento para a reprodução (natal homing). Atualmente, a população de Itaipu poderia ser constituída predominantemente por descendentes da população do médio rio Paraná que foi inundado pelo lago e ainda estaria se reproduzindo em locais distintos daqueles utilizados pela população da planície. Se, de fato, *P. corruscans* apresenta esse comportamento, a consequência seria um isolamento reprodutivo entre as duas populações, mesmo depois do alagamento ter possibilitado o intercâmbio genético. Assim, como a maturidade sexual em *P. corruscans* inicia-se por volta dos três anos de idade (Resende et al, 1995; Sato et al., 1997), o comportamento de volta ao local de nascimento teria prevenido o intercâmbio genético intenso entre as duas populações por, pelo menos, seis

gerações após o fechamento da barragem de Itaipu.

Embora seja sistematicamente detectada, a maior distância entre as populações de Itaipu e da planície em relação a Itaipu e Yacyreta constituiria uma evidência tênue para o comportamento de reprodução nos locais de nascimento, ou simplesmente locais diferentes para as duas populações. Portanto, estudos adicionais são necessários para demonstrar existência de locais preferenciais para a reprodução, que não seriam os mesmos para a planície de inundação e para a população de Itaipu.

Propagação vegetativa de *Lonchocarpus guilleminianus* (Fabacea) em floresta ripária regenerada, no município de Porto Rico (PR)

Introdução

A importância que as áreas ripárias têm na vida do homem moderno tem sido tratada por diversos autores (Souza, 1998; Souza, 1999; Rodrigues, 1991; Mantovani, 1989). Entretanto, sua relação com o equilíbrio do ecossistema aquático tem causado mais impacto, pois trata, dentre outras, de questões sobre a qualidade da água pelo consumo humano (Rizzi, 1963).

A bacia do rio Paraná abriga, dentre outras formações de menor extensão, a floresta estacional semidecidual, com características próprias, relacionadas, principalmente, à menor umidade e à riqueza específica inferior quando comparada com outros grandes domínios florestais brasileiros, como as florestas amazônica e atlântica (Leitão Filho, 1987).

Na região noroeste do Estado do Paraná e sudeste do Mato Grosso do Sul encontra-se um importante trecho do rio Paraná, com leito ainda não represado, onde diversos estudos

vêm sendo desenvolvidos (Vazzoler *et al.*, 1997). Estão sendo efetuados estudos de cunho botânico, com levantamento de flora (Souza *et al.*, 1997; Romagnolo *et al.*, 1994; Souza e Souza, 1998), da fitossociologia dos remanescentes florestais (Souza *et al.*, 1997), da dinâmica na restauração natural das florestas (Souza, 1998) e outros.

O estudo fitossociológico desenvolvido por Souza (1998) demonstrou a importância de *Lonchocarpus guilleminianus*, uma espécie heliófita, possui um remanescente florestal da margem esquerda do rio Paraná, município de Porto Rico (PR). Essa espécie, conhecida como feijão-cru ou imbira, é arbórea e pode atingir até 24 metros de altura. Ocupa a primeira colocação quanto ao Valor de Importância (VI). No cálculo de VI são somados os valores dos descritores estruturais de freqüência, densidade e dominância relativas. Nesta área, a estimativa de VI de *L. guilleminianus* abrange um quarto do VI total. Sendo um remanescente florestal resultante de uma regeneração natural ocorrida após intensa antropização, este resultado demonstra, inequivocamente, a importância que essa espécie teve na regeneração natural da área.

Aparentemente, a espécie *L. guilleminianus* apresenta a reprodução sexuada como principal estratégia reprodutiva em ambientes florestais com pouca ou nenhuma alteração na cobertura original (Souza, 1998). No entanto, esta autora encontrou indícios de que um mecanismo de propagação clonal poderia ser uma alternativa atuante nas fases iniciais de ocupação em áreas de queimada. Na colonização da área devastada pelo fogo formam-se aglomerados de plantas jovens que poderiam derivar de propagação vegetativa, por um brotamento de raízes. As plantas que tiverem sucesso formariam agrupamentos adultos em florestas regeneradas. O remanescente florestal de Porto Rico, mencionado anteriormente, possui agrupamentos de *L. guilleminianus* que poderiam ser originários de brotamentos.

No Laboratório de Genética Geral do DBC-UEM, condições de infra-estrutura e recursos humanos permitiram a interação com outros grupos de pesquisa e complementação de informações. Diante do crescente avanço das áreas de florestas perturbadas, esta foi uma oportunidade para aquisição de conhecimentos que subsidiem a elaboração de modelos de revegetação.

Neste trabalho, foi estudada a variabilidade genética de *L. guillemianus* na floresta ripária regenerada no município de Porto Rico, PR, via RAPD-PCR. Segundo Bastianel *et al*, estes marcadores têm se mostrado eficientes na identificação de clones.

Objetivos: Os principais objetivos propostos para o desenvolvimento deste trabalho foram:

Objetivo geral: Obter informações acerca do comportamento de *L. guillemianus* na colonização de áreas desflorestadas.

Objetivos específicos: Analisar a variabilidade genética, acessada pela técnica RAPD-PCR, na população de *L. guillemianus* existente em floresta ripária regenerada, às margens esquerdas do alto rio Paraná, em Porto Rico (PR);

Demonstrar, utilizando RAPD-PCR, a ocorrência de propagação vegetativa em *L. guillemianus* em floresta ripária regenerada, às margens do alto rio Paraná, em Porto Rico (PR).

Materiais e métodos

A quantificação e análise da variabilidade genética foi efetuada com a utilização da técnica de RAPD. Os procedimentos para a aplicação desta técnica foram conduzidos no Laboratório de Genética Geral do DBC-UEM e no Laboratório de Genética e Citogenética do Nupelia-UEM.

A amostragem para a investigação sobre a reprodução vegetativa foi realizada deliberadamente dentro de agrupamentos de

árvores. Conforme Souza (1998), caso derivassem de brotamentos as árvores estariam agrupadas em uma área com raio de 5 a 10 m.

Padronização da técnica de extração do DNA

Folhas jovens foram coletadas de grupos de indivíduos amostrados na população de *L. guillemianus*. As amostras foram refrigeradas para transporte. No laboratório as amostras foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e algumas repetições a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para melhor conservação do DNA. Extraíu-se o DNA total de todas as amostras utilizando-se o protocolo de extração de Doyle e Doyle (1987). Em seguida o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%. Essencialmente, a quantificação consistiu na comparação do DNA contido em determinado volume de cada amostra com quantidades conhecidas de DNA λ (Gibco BRL).

Avaliou-se o resultado obtido e então, testaram-se algumas amostras com o mesmo protocolo, porém com algumas alterações. As modificações introduzidas foram as seguintes: após a maceração das amostras com o mesmo protocolo e acréscimo de tampão, elas foram incubadas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ao invés de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ como no protocolo original, e o tempo de incubação foi reduzido de 30 minutos para quinze minutos. O DNA total foi ressuspensão em $30\text{ }\mu\text{L}$ de TE ao invés de $300\text{ }\mu\text{L}$. Procedeu-se da mesma forma com as amostras restantes. Durante os intervalos entre uma extração e outra, as amostras eram devidamente quantificadas. Ao término das extrações e respectivas quantificações, observou-se que algumas amostras produziram apenas 5 ng de DNA ou menos, enquanto que outras nem mesmo apresentaram DNA. Estes rendimentos seriam insuficientes para posterior amplificação. Na tentativa de solucionar este problema, nova extração foi realizada com a mesma técnica, mas com amostras armazenadas do freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, pois acreditava-se que estas estariam melhor preservadas. Os resultados mostraram-se satisfatórios para algumas amostras,

enquanto que a maioria continuava com pouco DNA. A solução foi encontrada após a utilização do protocolo de Murray e Thompson (1987), no qual utiliza-se CTAB, que mostrou-se eficiente para 100% das amostras que foram avaliadas. Para este protocolo foi utilizado o mesmo tampão de extração do anterior, apesar deste possuir um tampão diferente. Para análise dos resultados deste protocolo, outras extrações foram realizadas conforme necessárias e também para comparação com o protocolo anterior.

Amplificação do DNA com primers RAPD

O polimorfismo molecular foi avaliado com a técnica de RAPD-PCR, que se baseia na amplificação de segmentos de DNA genômico utilizando vários *primers* curtos (10-11 bases) de sequências nucleotídicas arbitrárias. Note-se que os primers RAPD amplificam sequências desconhecidas do DNA genômico. Cada *primer* se anela ao DNA em uma ou mais localidades, de acordo com o grau de homologia. A amplificação ocorre em regiões intermediárias aos *primers* pareados em fitas opostas, distantes até 4-4,5 kb. Esta técnica permite investigar variações no genoma baseando-se no número e tamanho dos fragmentos amplificados (fragmentos de RAPD).

As condições de amplificação de DNA foram baseadas na metodologia recomendada por Ferreira e Grattapaglia (1996). Foram testados *primers* dos kits OPA, OPX e OPW (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) para a seleção dos oligonucleotídeos que foram utilizados. No total, foram selecionados 11 *primers*: OPA02, OPA04, OPA07, OPA17, OPX01, OPX03, OPX04, OPX07, OPW03, OPW11 e OPW13. As amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1,4% e coradas com brometo de etídeo para a identificação e comparação dos fragmentos amplificados.

A variabilidade genética foi inferida pela proporção de locos polimórficos na população. Os testes para verificação de reprodução

assexuada foram analisados pela correspondência de fragmentos de DNA. A ocorrência de fragmentos diferenciais descartaria a possibilidade de dois indivíduos serem clones naturais.

Resultados e discussão

Durante a primeira extração, todas as amostras foram utilizadas e constatou-se que de 32 amostras, apenas 6 apresentaram resultados aproveitáveis (com peso de 5 ng a 50 ng). Após a modificação de alguns itens do protocolo de Doyle e Doyle (1987) (protocolo 1), verificou-se maior rendimento de DNA. Porém, ao final das extrações com o protocolo modificado, observou-se que algumas amostras apresentaram baixo rendimento, produzindo menos do que 5 ng de DNA, enquanto que de outras nem mesmo foi possível a detecção do DNA. A extração de DNA a partir folhas conservadas no freezer -70°C mostrou melhor resultado somente para alguns indivíduos. Os testes com o protocolo de Murray e Thompson (1987) produziram resultados consistentes em 100% das amostras analisadas. Posteriormente, amostras que haviam sido processadas com o protocolo de Doyle e Doyle (1987) original e modificado, foram testadas com protocolo de Murray e Thompson (1987) e na maioria dos casos os produtos foram de 20 a 100 ng de DNA. A Figura 1 mostra exemplos de indivíduos aos quais os dois protocolos foram testados, podendo-se observar que na maioria dos casos a extração de Murray e Thompson (1987) proporcionou maior rendimento. Na amplificação, o DNA extraído por todos os protocolos foi eficiente e de boa qualidade, ou seja, a maioria sem degradações. Portanto, para *L. guillemianus*, todos os protocolos testados extraem DNA de boa qualidade, porém, o que oferece um maior rendimento, tanto das amostras refrigeradas a -20°C como nas refrigeradas a -70°C , é, de acordo com os resultados obtidos, o protocolo de extração com CTAB de Murray e Thompson (1987).

Em relação à amplificação das amostras, os

fragmentos de DNA dos cinco grupos amostrados foram avaliados. Em dois grupos deles foram encontrados indivíduos com padrões de bandas idênticos. Contudo, constatou-se também que muitos indivíduos dentro de um agrupamento possuíam perfis de bandas diferentes. A Figura 2-A mostra marcadores moleculares em dois indivíduos do grupo A e dois indivíduos do grupo B, indicando que esses indivíduos possam ser clones.

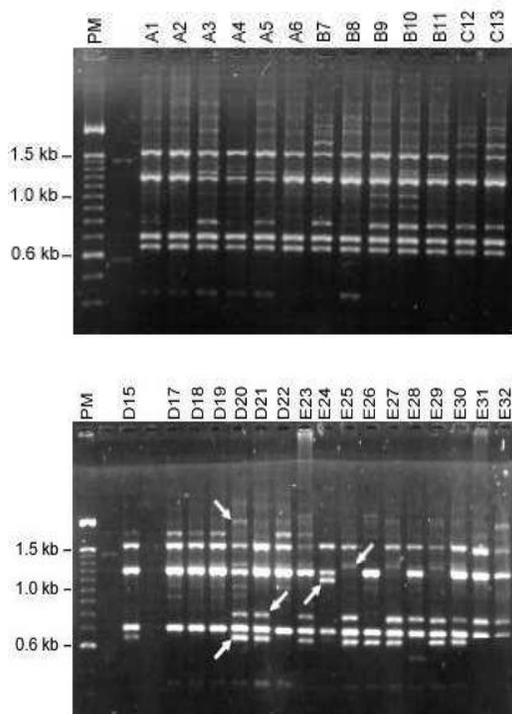


Figura 2-A e 2B – Marcadores moleculares de *L. guilleminianus* amplificados com primer OPAO7. PM=Peso molecular; A1 a A6=indivíduos do grupo A; B7 a B11 = indivíduos do grupo B; C12 a C13 = indivíduos do grupo C; D15 a D22 = indivíduos do grupo D; E23 a E32 = indivíduos do grupo E. Setas: marcadores que indicam polimorfismo entre os indivíduos da população de *Lonchocarpus guilleminianus*

Observa-se porém, na Figura 2-B, marcadores moleculares (setas) que revelam diferenças dentro de um mesmo grupo, pela sua presença em alguns indivíduos e ausência em outros, sugerindo que esses indivíduos sejam derivados de reprodução sexual. Portanto, com base nos resultados obtidos, as análises feitas sugerem que nesta espécie a estratégia de ocupação de áreas desflorestadas poderia estar baseada em uma combinação de propagação clonal e reprodução sexual.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a estratégia de ocupação de *Lonchocarpus guilleminianus* pode ser predominantemente sexuada, com ocorrência pouco frequente de propagação vegetativa

Diferenciação genética entre populações *Hemisorubim platyrhynchos* (Pisces: Pimelodidae) separadas pelos saltos de Sete Quedas, Rio Paraná

Introdução

A construção de reservatórios para a geração de energia elétrica é uma das alterações mais importantes para as espécies de ambientes aquáticos continentais. Uma das conseqüências dos barramentos de rios são as modificações na ictiofauna, impostas pela eliminação de barreiras geográficas, o que causa modificações no padrão de dispersão de várias espécies de peixes migratórios, introduzindo-as nas áreas a montante da barragem. Além disso, as barragens hidrelétricas constituem novas barreiras, impedindo a migração de peixes, podendo, dependendo das condições, levar à

extinção espécies menos aptas a suportar esse tipo de alteração.

Os saltos de Sete Quedas sempre foram considerados uma barreira eficiente que isolava as populações de peixes do médio e alto rio Paraná, embora em cheias excepcionais algumas espécies talvez pudessem transpô-la (Agostinho *et al.* 1997). A suposição de isolamento das populações a montante e a jusante de Sete Quedas é reforçada pelo fato de várias espécies que ocorriam no trecho médio não estarem representadas no alto rio Paraná.

As barreiras geográficas podem gerar polimorfismo intraespecíficos e divergências genéticas entre populações ao longo do tempo. Como consequência seria esperado que a intensidade e o tempo de isolamento seriam proporcionais à diferenciação genética das populações separadas por esse acidente geográfico (Hartl e Clark, 1989).

Com o represamento em 1982 e a formação do lago de Itaipu, um segmento do médio rio Paraná acima da barragem passou a ter continuidade com o alto rio Paraná. Mesmo que as populações de peixes estivessem geneticamente diferenciadas, com o contato das populações é possível que atualmente esteja em andamento um processo de redução das divergências genéticas. Ainda assim, devido ao pouco tempo de contato, as populações abaixo da barragem continuariam isoladas e as possíveis diferenças com a população a montante não seriam totalmente eliminadas, embora pudessem estar atenuadas pela mistura ocorrida com a formação do lago.

É possível testar a hipótese de que os saltos de Sete Quedas constituíam uma barreira efetiva para a migração de peixes. A condição de espécie migratória de *Hemisorubim platyrhynchos* (Burgess, 1989; Resende *et al.*, 1996) permitiu que fosse utilizada neste trabalho para obtenção de evidências de que os saltos de Sete Quedas constituíam uma barreira que promovia a diferenciação genética intraespecífica em espécies de peixes que

ocorrem nos segmentos médio e alto do rio Paraná.

Pretende-se, com este estudo, obter evidências de diferenciação genética entre as populações de *Hemisorubim platyrhynchos* separadas pelos saltos de Sete Quedas.

Materiais e métodos

A espécie *Hemisorubim platyrhynchos* (Figura 01), utilizada neste trabalho, é o único representante do gênero *Hemisorubim*. São tipicamente de água doce, atingem cerca de 30 cm de comprimento e possuem cabeça achatada. A nadadeira adiposa é bem desenvolvida e a nadadeira caudal inferior é mais desenvolvida que a superior. A estrutura da boca, com a mandíbula mais desenvolvida do que a maxila (prognatismo) e os dentes dispostos em faixa, como lixa, são indicadores de hábito alimentar carnívoro. A distribuição geográfica dessa espécie estende-se do Orenoco até a bacia platina. Na região do alto rio Paraná é conhecida como jurupoca. Outra constatação é o hábito migratório e a presença muito freqüente de *H. platyrhynchos* junto à calha do rio ou, pelo menos, em ambientes que tenham ligação muito próxima com o leito principal do rio (Burgess, 1989; Resende *et al.*, 1996).

Foram coletadas amostras de músculo e nadadeira adiposa de 18 indivíduos da espécie *Hemisorubim platyrhynchos* da planície de inundação do alto rio Paraná (ver Fig.1-item sobre *Gymnotus*) e de 8 indivíduos da região de Yacyreta no Paraguai. As amostras de 10 indivíduos da planície de inundação foram retiradas de peixes do trabalho de mestrado desenvolvido por G.M. Guidelli, do laboratório de Ictioparasitologia do Nupelia. Os membros da equipe do laboratório de Genética Geral (DBC-Nupelia) S.M.A.P. Prioli e E.S. Sekine coletaram, respectivamente, 7 indivíduos na planície de inundação e 8 indivíduos em Yacyretá no Paraguai. Todas as amostras foram armazenadas em tubos de polipropileno contendo etanol 100%.



Figura 01 – Exemplar da espécie *Hemisorubim platyrhynchos* (Pisces: Siluriformes/Pimelodidae) que ocorre nos segmentos médio e alto do rio Paraná.

Para extração de DNA total a metodologia utilizada foi adaptada da técnica utilizada por Whitmore *et al.* (1992). A estimativa da quantidade de DNA presente em cada amostra foi feita através da comparação com o DNA do fago λ de concentração conhecida, por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

As duas populações foram comparadas pela técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que se baseia na amplificação de DNA genômico utilizando vários *primers* curtos (10–11 bases) de seqüências nucleotídicas arbitrárias, que amplificam seqüências desconhecidas do DNA. Cada *primer* se anela ao DNA em uma ou mais localidades, de acordo com o grau de homologia, permitindo a amplificação das regiões intermediárias aos *primers*. Esta técnica consiste em submeter uma mistura a 40 ciclos, onde cada ciclo possui três etapas. Na etapa 1, o DNA contendo a seqüência a ser amplificada é desnaturado pelo calor a cerca de 94 °C. Na etapa 2, o DNA desnaturado é resfriado para 37-55 °C e os *primers* que estão em excesso e se anelam à seqüências complementares (sítios de

iniciação). Na etapa 3, a mistura de reação é aquecida para 72 °C e a *Taq* polimerase é estável por bastante tempo a temperatura de 94 °C. Após a etapa 3, novamente todo o DNA do tubo é aquecido e desnaturado, inclusive as moléculas recém sintetizadas. Ocorre outra fase de anelamento de *primers* e novamente a *Taq* polimerase sintetiza cadeias utilizando os moldes. A amplificação é exponencial e dura cerca de 5 horas.

As condições de amplificação do DNA foram baseadas na metodologia utilizada por Bardack e Skibinski (1994). Os seguintes *primers* dos kits *OPW*, *OPX* e *OPA* (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) foram testados: OPW-01, OPW-02, OPW-03, OPW-04, OPW-05, OPW-06, OPW-07, OPW-08, OPW-09, OPW-10, OPW-11, OPW-12, OPW-13, OPW-14, OPW-15, OPW-16, OPW-16, OPW-17, OPW-18, OPW-19, OPW-20, OPX-01, OPX-02, OPX-03, OPX-04, OPX-08, OPX-20 e OPA-04. Desses *primers* foram selecionados aqueles que apresentaram o maior número de bandas nítidas: OPX01, OPX04, OPW01, OPW03, OPW05, OPW06, OPW08, OPW09, OPW15, OPW16 e OPW19. Após a seleção dos *primers* as amostras

foram amplificadas e os fragmentos separados em gel de agarose 1,4% e corados com brometo de etídio para registro fotográfico e posterior comparação.

Cada indivíduo produz um perfil eletroforético com determinado *primer*. Portanto, as comparações foram realizadas a partir do conhecimento da presença (1) ou ausência (0) de fragmentos RAPD para cada indivíduo. Neste trabalho foi empregada a metodologia desenvolvida por Lynch (1990, 1991) e Lynch e Milligan (1994) especialmente para comparações de indivíduos através de marcadores polimórficos de RAPD. Pelo método de análise, inicialmente é calculado como um índice de similaridade entre os indivíduos p e y (S_{xy}).

O índice de similaridade dentro de uma população (S) é calculado como sendo a média de todas as similaridades individuais (S_{xy}) possíveis dentro da população. Em seguida, são calculados os coeficientes de similaridades entre todos os pares de populações (S'_{ij}), corrigida para a similaridade dentro da i -ésima e da j -ésima populações. A similaridade entre populações deriva da média das similaridades entre indivíduos da i -ésima população pareados aleatoriamente com indivíduos da j -ésima população (S'_{ij}). O índice S'_{ij} é convertido em distância genética (D'_{ij}). Além disso, também foi calculada a estatística F'_{ST} de Lynch (1990, 1991), que é análogo da estatística F_{ST} de Wright. O valor de F'_{ST} varia desde zero, quando há completa homogeneidade entre as populações amostradas, até 1, quando haveria completa subdivisão entre as amostras (Bardakci e Skibinski, 1994). Também foi verificado se as populações estão conectadas por fluxo gênico (Nm).

Resultados e discussão

A Figura 03 ilustra a eletroforese em gel de produtos de amplificação por RAPD em *H. platyrhynchos* a partir do primer OPW-06. A

primeira raia corresponde ao marcador Ladder, a segunda raia representa o controle negativo ou branco (mistura de reação sem DNA). Cada uma das raias subseqüentes mostra o perfil eletroforético de um indivíduo estudado.

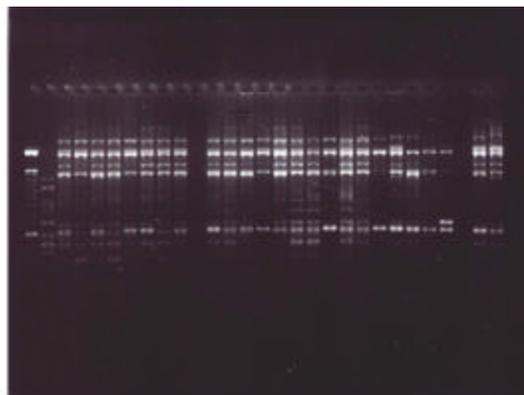


Figura 03 – Fingerprints de fragmentos RAPD-PCR de *Hemisorubim platyrhynchos* produzidos com o primer Operon OPW-06.

Foram detectados 78 locos com bandas nítidas. No entanto, somente 25 locos apresentaram polimorfismo pelo critério de 5%, isto é, são considerados polimórficos os locos cujos alelo mais raro tem frequência igual ou superior a 5%. Por esse critério, portanto, a porcentagem de locos polimórficos foi 32%. Esta proporção de locos polimórficos é aproximadamente a que foi encontrada para o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), conforme Sekine *et al.* (dados em preparo para publicação).

A distância genética entre as populações de *H. platyrhynchos* da planície e de Yacyreta, estimada pela metodologia desenvolvida por Lynch (Lynch, 1990, 1991; Lynch e Milligan, 1994) foi $D' = 0,1813$. Este valor encontrado é expressivo e constitui, por si só, um indicador de divergência genética entre as duas populações.

As estimativas do índice de $F'_{ST} = 0,181$ e do fluxo gênico $Nm = 1,1$ representam

evidências adicionais do distanciamento das populações. O fluxo gênico, dado pelo equivalente ao número de migrantes por geração Nm , é uma força contrária e impõe um limite à diferenciação genética. Valores de Nm maior do que 1 são indicativos de que a divergência genética está sendo refreada (Hartl e Clark, 1989). A estimativa de $Nm = 1,1$ que seria o que ainda permanece como equivalente de migrantes por geração, sugere que as populações de *H. platyrhynchos* separadas pelos saltos de Sete Quedas não estavam fortemente conectadas por fluxo gênico. Portanto, não haveria tendência de homogeneização genética das duas populações.

Foi também aplicado o teste exato de Fisher para a diferenciação genética entre populações (Raymond e Rousset, 1995). O teste produziu um $X^2 = 90,13$ com $GL = 50$ e $P < 0,01$. Este resultado revela que é significativa a diferenciação genética entre a população da planície e de Yacyreta, confirmando e fortalecendo as conclusões baseadas nos outros parâmetros genéticos estimados.

O conjunto de resultados obtidos são consistentes em evidenciar que as populações de *H. platyrhynchos* acima e abaixo de Sete Quedas estão geneticamente diferenciadas. Pode ser aventado que o distanciamento entre as populações atualmente seria resultante do isolamento reprodutivo imposto pelos saltos de Sete Quedas. O isolamento entre as populações não seria absoluto, como revelado pela baixa intensidade de migração entre as duas populações. Possivelmente, não havia migração de indivíduos adultos para a parte superior do rio Paraná, a não ser, talvez, em cheias excepcionais. Por outro lado, ovos e larvas da população a montante poderiam transpor, com certa regularidade, a cachoeira para a parte do médio rio Paraná. Aparentemente, a migração ocorreria em pequena escala, mas a conexão por fluxo gênico seria suficiente para evitar a divergência genética das duas populações até patamares irreversíveis, característicos de espécies diferentes. Portanto, podemos inferir que Sete Quedas constituía uma barreira que,

embora não fosse absoluta, teria sido eficiente em impedir a homogeneização genética das populações de *Hemisorubim platyrhynchos* residentes a montante e a jusante.

Polimorfismo molecular em populações de *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae)

Introdução

A família Erythrinidae é composta pelos gêneros *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus*. Pertencem ao gênero *Hoplias* os peixes conhecidos como traíra. São peixes carnívoros e de comportamento sedentário. Sua distribuição geográfica é ampla e são encontrados na América do Sul e na América Central (Morelli, 1998).

A taxonomia dentro de *Hoplias* é confusa, com conflitos entre os autores quanto ao número de espécies. Neste gênero são reconhecidas e bem definidas as diferenças entre os grupos *malabaricus* e *lacerdae*. Cada um desses grupos poderia ser composto por espécies ainda não definidas (Oyakawa, 1990, citado por Morelli, 1998). Existem evidências de inconsistências taxônomicas nesse gênero, com conflitos quanto ao número de espécies. Neste gênero são reconhecidas e bem definidas as diferenças entre os grupos *malabaricus* e *lacerdae*. Cada um desses grupos poderia ser composto por espécies ainda não definidas. Assim, o que se considera como espécie *Hoplias malabaricus* constituir-se-ia em um complexo de espécies diferentes, como apontam diversas análises citogenéticas (Bertollo *et al.*, 1997a).

Dentro do grupo considerado como a espécie *H. malabaricus* têm sido encontrados citótipos ou diferenças cariotípicas significativas. As divergências ao nível cromossômico são, às vezes, de tal magnitude que revelam, inclusive,

a possibilidade de isolamento reprodutivo entre algumas populações conhecidas. A diferenciação cromossômica tem sido encontrada em diversos níveis. Na maioria das populações o número de cromossomos varia de 39 a 42. Além disso, são comuns diferenças nas formas dos cromossomos, indicando a ocorrência frequente de rearranjos cromossômicos. Até mesmo os mecanismos de determinação do sexo são complexos e não são homogêneos entre as populações, com cromossomos sexuais múltiplos (Bertollo *et al.*, 1983, 1997b).

Apesar de morfologicamente todas essas populações serem, preliminarmente, consideradas como *H. malabaricus*, com base nas informações citogenéticas foi possível caracterizar pelo menos cinco grupos com citótipos diferenciais. Essas constatações talvez forcem, futuramente, uma revisão taxonômica do gênero *Hoplias* (Bertollo *et al.*, 1978, 1997a,b; Dergan *et al.*, 1998; Dergan e Bertollo, 1990).

A emergência desses citótipos em *H. malabaricus* poderia resultar, pelo menos parcialmente, do hábito sedentário da espécie e da baixa intensidade de migração. Essa característica talvez induza a formação de populações locais ou subpopulações com pouca conexão por fluxo gênico, como decorrência de isolamento-por-distância. Portanto, apesar da falta de consenso sobre a importância das variações cariotípicas como fator evolutivo, os citótipos poderiam ser interpretados como reflexos cromossômicos de adaptações bem sucedidas.

Pelo menos na atualidade, os grupos detectados não estão todos geograficamente isolados. Em algumas regiões pode ocorrer simpatria de citótipos (H.F. Júlio Jr., comunicação pessoal). As traíras da espécie *H. malabaricus* são abundantes em ambientes lenticos na planície de inundação do alto rio Paraná (Agostinho *et al.* 1997; Agostinho e Zalewski. 1996), mas não existem informações

seguras sobre o(s) citótipo(s) que compõem as populações dessa região. A equipe do Prof. H.F. Júlio Jr, do Laboratório de Citogenética de Peixes do DBC-UEM, está iniciando investigação das populações de traíras nesta região.

Neste trabalho, foi investigada a associação entre marcadores moleculares RAPD e os citótipos de *H. malabaricus* que ocorrem na planície de inundação do alto rio Paraná.

Materiais e métodos

Oito exemplares de *H. malabaricus* foram capturados na planície de inundação do alto rio Paraná, na região de Porto Rico (Figura 01). Os indivíduos coletados foram mantidos vivos e transportados para a Universidade Estadual de Maringá, onde foram primeiramente analisados citogeneticamente pela equipe do Prof. Dr. Horácio Ferreira Júlio Jr. Depois de mortos, de cada indivíduo foi coletada amostra de músculo e/ou fígado para análise molecular.

O polimorfismo molecular foi obtido com a utilização da técnica de RAPD. Houve controle individual durante a obtenção de material biológico para as análises moleculares e cromossômicas, isto é, as informações foram pareadas. Portanto, os fragmentos amplificados puderam ser associados os citótipos de *H. malabaricus* da região de Porto Rico.

Para a extração do DNA total, a metodologia utilizada foi adaptada da técnica utilizada por Whitmore *et al.* (1992). Setores de tecido muscular preservados em etanol absoluto foram homogeneizados em tubo eppendorf contendo 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA, 0,1% de SDS, 50 mM de ditioneitol (DTT) e proteinase K (2,5 µg/mL) por 24 horas em banho-maria a 42 oC. Em seguida, o DNA foi purificado com uma extração de fenol/Tris pH 8,0 e duas de clorofórmio/isoamílico (24:1). O DNA obtido foi precipitado com etanol 100% e ressuspenso em tampão TE. A estimativa da quantidade de DNA presente em cada amostra

foi efetuada pela comparação com quantidades conhecidas do DNA do fago λ , por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A técnica de RAPD (Williams et al., 1990) baseia-se na amplificação de segmentos de DNA genômico utilizando vários primers curtos (10-11 bases) de sequências nucleotídicas arbitrárias. Os segmentos amplificados são constituídos por sequências desconhecidas do DNA. Cada primer se anela ao DNA em uma ou mais localidades, de acordo com o grau de homologia, permitindo a amplificação das regiões intermediárias aos primers. Esta técnica permite investigar variações no genoma em função do número e tamanho dos fragmentos amplificados (fragmentos de RAPD).

As condições de amplificação do DNA foram as utilizadas por Bardakci e Skibinski (1994). Os primers provenientes dos kits OPA e OPX (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) foram testados para a seleção dos oligonucleotídeos. Para a escolha dos primers, foi realizada 30 reações de RAPD, utilizando um indivíduo para todas as reações e um primer diferente para cada reação. Estas reações foram analisadas em gel de agarose 1,4% e dentre os trinta primers testados, foram selecionados aqueles que apresentaram maior número de bandas nítidas. Os primers selecionados foram: OPX-04, OPW-09, OPW-16 e OPW-19.

Resultados e discussão

Com a análise citogenética foram identificados três citótipos ou variantes cariotípicas. Foram encontrados um macho com 39 cromossomos, quatro fêmeas com 40 cromossomos e duas fêmeas e um macho com 42 cromossomos. Os resultados da amplificação, via RAPD, com os primers selecionados mostraram consistentemente que é possível separar os indivíduos estudados em três grupos distintos. Para determinar estes grupos, cada indivíduo foi analisado pelas bandas produzidas e pela ausência de bandas. Ou seja, os

indivíduos que apresentam o mesmo perfil eletroforético, foram classificados como pertencentes ao mesmo grupo, e aqueles indivíduos que apresentaram padrões eletroforéticos diferentes, foram classificados em grupos diferentes, em outras palavras, os grupos foram identificados por não comparilharem os alelos dominantes revelados por RAPD.

Na Figura 01 são mostrados os três grupos diferentes. Facilmente pode-se identificar cada grupo pelo padrão de bandas produzidos. O primeiro grupo foi formado por indivíduos com 42 cromossomos. Neste caso a verificação da configuração cariotípica seria suficiente para a identificação de membros desse grupo. Um segundo grupo é formado por um macho com 39 cromossomos e uma fêmea com 40 cromossomos. Um terceiro grupo é formado por duas fêmeas e um macho com 40 cromossomos. Estes resultados demonstram que o grupo malabaricus da planície de inundação do alto rio Paraná estaria representado por pelo menos três citótipos diferentes, que estão associados a diferentes marcadores RAPD-PCR.

Aqui deve ser ressaltado que somente com a análise citogenética não seria possível discriminar com facilidade a fêmea com 40 cromossomos do segundo das duas fêmeas com 40 cromossomos do terceiro grupo. Uma dificuldade adicional da análise citogenética é a necessidade do início dos preparativos com o animal ainda vivo. Por outro lado, com a metodologia RAPD a amplificação dos fragmentos pode ser realizada facilmente. O DNA pode ser obtido sem necessidade de sacrifício do animal ou de tecido fresco de animais mortos e até mesmo preservados por longo tempo em freezer ou álcool. Tecidos preservados em formol não têm produzido resultados satisfatórios.

Como visto, as divergências mostradas pelas análises moleculares foram acentuadas. O fato dos grupos encontrados não compartilharem quase todos os alelos amplificados sugerem que

há grande distância genética entre eles e que estariam reprodutivamente isolados e poderiam ser caracterizados como espécies diferentes. Portanto, estes resultados constituem evidência adicional de que o grupo malabaricus é um complexo de espécies e que há necessidade de revisão taxonômica.

Comparação entre a Variabilidade Genética de *Hoplias Malabaricus* (BLOCH, 1794) (Osteichthyes: Erythrinidae) de rio e de lagoas da planície de inundação do alto rio Paraná.

Introdução

São poucos os estudos relacionados com alterações bioquímicas em peixes de diferentes habitats, com intuito de conservação do patrimônio genético de populações naturais, em comparação com estudos de outros aspectos ecológicos. O estudo, em nível molecular, das estratégias adaptativas a ambientes extremamente variáveis é um dos meios pelos quais é possível elucidar os caminhos evolutivos de um determinado grupo

Em termos mundiais já existe há algum tempo uma preocupação efetiva e contínua com a conservação genética de populações selvagens utilizadas em programas de pesca e aquicultura, a fim de evitar a depleção dos estoques pesqueiros naturais.

O desenvolvimento da técnica de eletroforese unidas a técnicas de coloração permitiram a detecção de enzimas e outras proteínas polimórficas e possibilitaram a primeira interpretação simples de marcadores genéticos em larga escala para estudos de populações naturais.

A eletroforese de enzimas tem sido usada no estudo de genética de populações naturais como: uma ferramenta da sistemática na resolução de problemas taxonômicos de grupos de difícil identificação, detectando a diversidade dentro e entre as populações e auxiliando no entendimento de fatores que contribuem para a adaptação das espécies. Em resposta as pressões ambientais, enzimas-chave do metabolismo podem atuar de maneira diferente aumentando a capacidade da espécie de explorar nichos

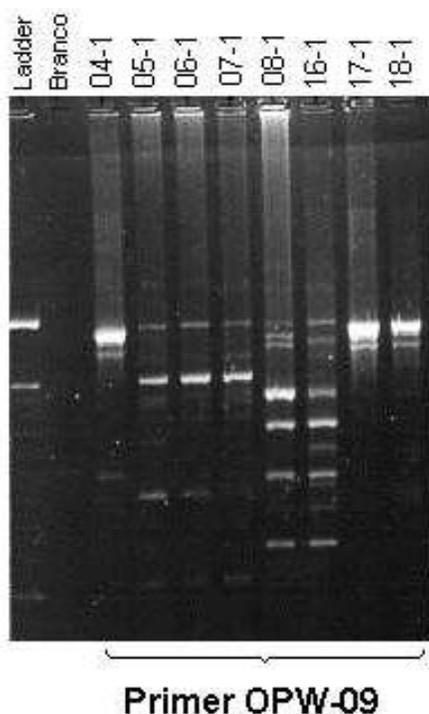


Figura 01 - *Fingerprints* de oito indivíduos de *H. malabaricus* da planície de inundação do alto rio Paraná. Os indivíduos 05-1, 06-1 e 07-1, com 42 cromossomos, produziram o mesmo perfil eletroforético. Um macho com 39 cromossomo (08-1) e uma fêmea com 40 cromossomos (16-1) apresentaram essencialmente o mesmo padrão, porém diferente de todos os outros indivíduos. Um terceiro grupo completamente diferente quanto ao padrão de bandas foi constituído por três fêmeas com 40 cromossomos (04-1, 17-1, 18-1).

ecológicos que *a priori* lhes seriam desfavoráveis.

A espécie *Hoplias malabaricus* (traíra) adulta apresenta comportamento sedentário e territorialista, podendo ser encontrada em ambientes fluviais e lacustres e por isso foi escolhida para este trabalho. Esta espécie é encontrada esporadicamente na calha principal do rio Paraná, sendo abundante em lagoas temporárias e permanentes.

É possível que, a partir de uma seqüência lógica de investigação, monitoramento e manejo, realizados com objetivos claros e concisos, o impacto antrópico sobre a diversidade genética das espécies de peixes de água doce possa ser minimizado evitando uma erosão no patrimônio genético das populações naturais.

Materiais e métodos

Foram coletados 24 indivíduos no rio Paraná no canal próximo a ilha Itajaí e 27 numa lagoa da ilha Barbado (próximo ao Porto 18), usando anzol como instrumento de pesca. Destes organismos foram extraídos o olho, o fígado, coração e pedaço de músculo branco e congelados em nitrogênio líquido. Em seguida o animal era fixado em formol. Para serem analisados, os tecidos foram homogeneizados com bastões de plástico em tubos Eppendorf de 1,5 ml juntamente com 4 gotas de solução tampão Tris/HCl 0,02M, pH 7,5. Uma vez que o fígado tem grande quantidade de gordura, foi adicionado Tetracloreto de carbono às amostras de fígado na proporção de 1:2 (tecido:tetracloreto) e em seguida centrifugados a 25.000 rpm (47720 x g), a 1- 5°C, durante 30 minutos. O sobrenadante foi submetido à eletroforese horizontal em gel de amido de milho (Penetrose 30) coberto com gelo. Dois tampões foram empregados nas eletroforeses: Tris 0,135 M/Ácido cítrico 0,043 M, pH 7,0 (TC) na cuba e diluído 15 vezes no gel; Tris 0,18 M/Ácido Bórico 0,1 M/EDTA 0,004M pH

8,6 (TBE) diluído 4 vezes no gel. As eletroforeses foram realizadas durante 6 horas a 5°C com diferença de potencial de 250 V para o gel de Tris-citrato, e 450 V para o gel de Tris-borato-EDTA. Os géis serão fatiados horizontalmente e revelados separadamente para cada enzima.

Resultados e discussão

Foram analisados 14 sistemas enzimáticos: AAT (E.C.2.6.1.1), ADH (E.C.1.1.1.1), EST (E.C.3.1.1.1), G3PDH (E.C.1.1.1.8), G6PD (E.C.1.1.1.49), GPI (E.C.5.3.1.9), IDDH (E.C.1.1.1.14), IDHP (E.C.1.1.1.42), LDH (E.C.1.1.1.27), MDH (E.C.1.1.1.37), MEP (E.C.1.1.1.40), PGM (E.C.5.4.2.2), PER (E.C.1.11.1.7), e SOD (E.C.1.15.1.1). As enzimas AAT, EST, G3PD, IDDH e SOD tiveram sua expressão limitada ao fígado. G6PD e PER não mostraram atividade no músculo. GPI teve boa expressão no coração e fígado mas foi vista fracamente corada no músculo e olho. As demais apareceram fortemente coradas nos 4 tecidos mas com divergência bidirecional, isto é, em um tecido a isoenzima mais ativa é mais anódica e em outro é a menos anódica. Os 15 sistemas enzimáticos estudados permitiram detectar 24 loci gênicos. O número de alelos por loco variou de 1 a 3. Oito locos no peixes do rio e 9 nos da lagoa mostraram mais de um alelo (polimórficos). Estes dados permitiram calcular o diversidade genética como sendo 0,14 no rio e 0,136 na lagoa, isto é, cada peixe é heterozigoto para 14% dos seus genes. Este valor é alto quando comparado à média de 129 espécies de peixes que é 0,05 (5%). Podemos afirmar que tanto na lagoa como no rio, a traíra apresenta um variabilidade genética 3 vezes maior que a média das espécies de peixes analisadas até agora. Comparando as duas populações, elas diferem significativamente na frequência gênica.

Concluindo, recomendamos que os habitats desta espécie (raízes das plantas aquáticas) sejam preservados para permitir a manutenção de tão alta variabilidade genética

Referências

- AGOSTINHO, A. A.; JULIO JÚNIOR, H. F. Peixes da Bacia do Alto Paraná. In: LOWE-MCCONNEL, R. H. *Estudos ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1999.
- AGOSTINHO, A. A.; JULIO JUNIOR, H. F.; PETRERE JUNIOR, M. Itaipu reservoir (Brazil): impacts of the impoundment on the fish fauna and fisheries. In: COWX, I. G. (Ed.) *Rehabilitation of freshwater fisheries*. Osney Mead, Oxford: Fishing News Books, 1994. p. 171-184.
- AGOSTINHO, A. A.; JULIO JUNIOR, H. F.; BORGHETTI, J. R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. *Revista UNIMAR*, Maringá, v. 14, supl., p. 89-107, 1992.
- AGOSTINHO, A. A.; JULIO JUNIOR, H. F.; GOMES, L. C.; BINI, L. M.; AGOSTINHO, C. S. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A.E.A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM, 1997. p. 179-208.
- AGOSTINHO, A. A.; ZALEWSKI, M. *A planície alagável do alto rio Paraná: importância e preservação*. Maringá: EDUEM, 1996. 100 p.
- ALMEIDA, F. S. *Análise da variabilidade genética em Pimelodidae e Rhamdiidae (Pisces-Siluriformes) da bacia do rio Tibagi*. 1998. 102 f. : il. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- BARBIERI, M. C. *Contribuição ao estudo da biologia de Gymnotus carapo (Linnaeus, 1758) na Represa Lobo. Estado de São Paulo. (Pisces, Ostariophysi, Gymnotidae)*. 1981. 220 f. Tese (Doutorado).
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of the RAPD technique in Tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, v. 73, p. 117-123, 1994.
- BASTIANEL, M.; SCHWARZ, S. F.; COLETA FILHO, H. D.; LIN, L. L.; MACHADO, M.; KOLLER, O. C. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Genetics and Molecular Biology*, v. 21, p. 123-127, 1998.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética*, v. 1, p. 103-120, 1978.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia*, v. 48, p. 1-12, 1983.
- BERTOLLO, L. A. C. *Estudos citogenéticos no gênero Hoplias Gill 1903 (Pisces; Erythrinidae)*. 1978. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- BERTOLO, L. A. C.; FONTES, M. S.; FENOCCHIO, A. S.; CANO, J. The X₁X₂Y Sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I, G-, C- and chromosome replication banding. *Chrom. Res.* v. 5, p. 493-499, 1997b.
- BERTOLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; FONTES, M. S. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Cytotypes with 2n=40 chromosomes. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 20, p. 237-342, 1997a.
- BIELAWSKI, J. P.; PUMO, D. E. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. *Heredity*, v. 78, p. 32-40, 1997.
- BILLINGTON, ; STRANGE, R. M. Mitochondrial DNA analysis confirms the existence of a genetically divergent Walleye population in Northeastern Mississippi. *Transaction American Fisheries Society*, v. 124, p. 770-776, 1995.
- BONETTO, A. A. Fish of the Parana system. In: DAVIES, B. R.; WALKER, K. F. (Ed.). *The ecology of river systems*. Dordrecht, The Netherlands: Dr. W. Junk Publishers, 1986. p. 573-588.
- BORIN, L. A.; JÚLIO JUNIOR, H. F. Ocorrência de um novo citótipo de *Gymnotus carapo* (SILURIFORMES - Gymnotoidei) no alto rio Paraná. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 5., 1994, Botucatu. Botucatu: UNESP.
- BOROWSKY, R.L.; MCCLELLAND, M.; CHENG, R.; WELSH, J. Arbitrarily primed DNA fingerprinting for phylogenetic reconstruction in vertebrates: The

- Xiphophorus* model. *Molecular Biology. Evolution.*, v. 12, no.6, p. 1022-1032, 1995.
- BURGESS, W. E. *An atlas of the freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes*. Neptune City, New Jersey: T.F.H. Publications, 1994.
- CACCONI, A.; ALLEGRUCCI, G.; FORTUNATO, C.; SBORDONI, V. Genetic differentiation within the european sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays. *Heredity*, v. 88, p.316-324, 1997.
- CALLEJAS, C.; OCHANDO, M. D. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *Journal of Fish Biology*, v. 53, p. 208-215, 1998.
- CRUZ, C. D. *Programa Genes. Aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: Ed. da UFV, 1997. 442 p.
- DERGAN, J. A.; BERTOLO, L. A. C. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná Basins. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 13, p. 755-766, 1990.
- DERGAN, J. A.; SUZUKI, H. I.; SHIBATTA, O. A.; DUBOC, L. F.; JÚLIO JUNIOR., H. F.; GUILIANO-CAETANO, L.; BLACK IV, W. C. Molecular biogeography of the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguacu, Tibagi, and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 21, p. 493-496, 1998.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1987.
- ELO, K.; IVANOFF, S.; VUORINEN, J. A.; PIIRONEN, J. Inheritance of RAPD markers and detection of hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture*, v. 152, p. 55-65, 1997.
- ELO, K.; IVANOFF, S.; VUORINEN, J.A.; PIIRONEN, J. Inheritance of RAPD markers and detection of hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture*, v. 152, p. 55-65, 1997.
- FERNANDES-MATIOLI, F. M. *Evolução e estrutura de populações no gênero Gymnotus (Pisces: Gymnotiformes)*. 1999. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FERREIRA, M. E.; Grattapaglia, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p.
- GODINHO, H. P., GODINHO, A. L. Ecology and conservation of fish in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 5, p. 187-197, 1994.
- GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L.; FORMAGIO, P. S.; Torquato, V. C. Fish ladder efficiency in a southeastern Brazilian river. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 43, p. 63-67, 1991.
- GUPTA, M.; CHYI, Y.-S.; ROMERO-SEVERSON, J.; Owen, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*, v. 89, p. 998-1006, 1994.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. *Principles of population genetics*. 2nd ed. Sanderlond, Massachussets: Sinauer Associates, 1989.
- JAYASANKAR, P.; DHARMALINGAN, K. Potential application of RAPD and RAHM markers in genome analysis of scombroid fishes. *Current Science*, v. 72, no. 6, p. , 1997.
- KIRPICHNIKOV, V. S. Adaptive nature of intrapopulational biochemical polymorphism in fish.. *Journal of Fish Biology* 40: 1-16; 1992.
- KUUSIPALO, L. Genetic differentiation of endemic Nile perch *Lates stappersi* (Centropomidae, Pisces) population in Lake Tanganika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia*, v. 407, p. 141-148, 1999.
- LEITÃO FILHO, H. F. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais. *Bol. IPEF*, Piracicaba, v. 35, p. ? , 1987.
- LIU, Z. J.; Li, P.; ARGUE, B. J.; DUNHAM, R. A. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, v. 174, p. 59-68, 1999.
- LYNCH, M. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting. In: BURKE, T.; DOLF, G.; JEFFREYS, A.J.; WOLF, R. (Ed.). *DNA fingerprinting approaches and applications*. Basel, Switzerland: [S.n.], 1991. p. 113-126.
- LYNCH, M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology Evolution*, v. 7, p. 478-484, 1990.
- LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular*

Ecology, v. 3, p. 91-99, 1994.

MANTOVANI, W. Conceituação e fatores condicionantes. In: Barbosa, L.M. (Ed.). *Anais do Simpósio sobre Mata Ciliar*. São Paulo; Campinas: Fundação Cargill, 1989. p. 11-19.

MARQUES, E. E. *Biologia reprodutiva, alimentação natural e dinâmica da nutrição do pintado Pseudoplatystoma coruscans (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) no alto rio Paraná*. 1993. 104 f. : il. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

METTLER, L. E.; GREEG, T. G. *Genética de populações e evolução*. São Paulo: Polígono: Ed. da USP, 1973.

MORELLI, S. *Citogenética evolutiva em espécies do gênero Hoplias, grupo lacerdae. Macroestrutura Cariotípica, Heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo*. 1998. 76 f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A.; SCHARF, S. J.; SAIKI, R. K.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, v. 51, p. 263-273, 1986.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

POWERS, A. D. AND SCHULTE, P. M. Evolutionary adaptations of gene structure and expression in natural populations in relation to a changing environment: a multidisciplinary approach to address the million-year saga of a small fish. *Journal of Experimental Zoology* 282: 71-94, 1998.

RAYMOND, M. L.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. *Evolution*, v. 49, p. 1280-1283, 1995.

RESENDE, E. K.; PEREIRA, R. A. C.; ALMEIDA, V. L. L.; SILVA, A. G. *Alimentação de peixes carnívoros da planície inundável do rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil*. Corumbá, MS: Embrapa. CPAP, 1996.

REZENDE, E. K.; CATELLA, A. C.; NASCIMENTO, F. L.; PALMEIRA, S. S.; CANDIDO, R. A.; LIMA, M. S.; ALMEIDA, V. L. L. *Biologia do curimatá (Prochilodus lineatus), pintado (Pseudoplatystoma*

coruscans) e cachara (Pseudoplatystoma fasciatum) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil. Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP, 1996. 75 p. (Boletim de Pesquisa, 2).

RIZZI, N. E. Função da floresta na manutenção da qualidade da água para uso humano. *Revista Floresta*, p. 54-65, 1981

RODRIGUES, R. R. *Análise de um remanescente de vegetação natural às margens do rio Passa Cinco, Ipeúna, SP*. 1991. 325 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ROMAGNOLQ, M. B.; SOUZA, M. C.; FERRUCCI, M. S. Sapindaceae da planície de inundação do trecho superior do rio Paraná. *Revista UNIMAR*, Maringá, v. 16, n. 3, p. 61-81, 1994.

RYMAN, N.; UTTER, F. *Population genetics and fishery management*. Seattle: University of Washinton Press, 1987.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, A. R.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SATO, Y.; CARDOSO, E. L.; SALLUM, W. B.; GODINHO, H. P. Indução experimental da desova do surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. In: MIRANDA, M. O. T. (Org.). *Surubim*. Belo Horizonte: IBAMA, 1997. p. 69-79. (Coleção Meio ambiente. Série Estudos Pesca, 19).

SEKINE, E. S.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO JUNIOR, H. F.; PRIOLI, S. M. A. P.; CASTRO, L. L. Divergência genética entre populações do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Pisces-Siluriformes) do rio Paraná. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, supl., p. 100, 2000. Resumo.

SOKAL, R. R.; HOHLF, F. J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco, CA: W.H. Freeman & Co, 1969.

SOUZA, M. C. Algumas considerações sobre vegetação ripária. *Biodiversidade*, v. 2, 1999. No prelo

SOUZA, M. C. *Estrutura e composição florística da vegetação de um remanescente florestal da margem*

esquerda do rio Paraná (Mata do Araldo, Município de Porto Rico, PR). 1998. 172 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro.

SOUZA, M. C.; CILINSKI, J.; ROMAGNOLO, M. B. Levantamento florístico. In: VAZZOLER, A. E. A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM, 1997. p. 343-368.

STRICKBERGER, M. W. *Evolution*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1990. 579 p.

THOMAZ, S. M.; ROBERTO, M. C.; BINI, L. M. Caracterização limnológica dos ambientes aquáticos e influência dos níveis fluviométricos. In: VAZZOLER, A.E.A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM, 1997. p. 73-102.

VAZZOLER, A.E.A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM, 1977. 460 p.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primer. *Nucleic Acids Res.*, v. 18, p. 7013-7218, 1990.

WHITMORE, D. H.; THAI, T. H.; CRAFT, C. M. Gene amplification permits minimally invasive analysis of fish mitochondrial DNA. *Transaction American Fisheries Society*, v. 121, p. 170-177, 1992.

WHITMORE, D. H.; Thai, T. H.; CRAFT, C. M. Gene amplification permits minimally invasive analysis of fish mitochondrial DNA. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 121, p. 170-177, 1992.

WILLIAMS, D. J.; KAZIANIS, S.; WALTER, R.. B. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for identification of largemouth bass subspecies and their intergrades. *Transaction American Fisheries Society*, v. 127, p. 825-832, 1998.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.