

VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS

ALBERTO JOSÉ PRIOLI E HORÁCIO FERREIRA JÚLIO JR (COORDENADORES); SÔNIA MARIA ALVES PINTO PRIOLI, CARLA SIMONE PAVANELLI, MARIA CONCEIÇÃO DE SOUZA, CLÁUDIO HENRIQUE ZAWADZKI (PESQUISADORES), MARIZA BARION ROMAGNOLO; ALESSANDRA VALÉRIA DE OLIVEIRA, LAURA LEAL DE CASTRO (PÓS-GRADUANDAS); LÉIA CAROLINA LUCIO, PAULA SILVEIRA PERIOTO, VIVIAN AMANDA DE CARLO, RENATA DE SOUZA PANARARI, THIAGO CINTRA MANIGLIA (BOLSAISTAS PIC)

RESUMO

Foram desenvolvidas atividades relacionadas com a quantificação e avaliação da diversidade e estrutura genética de populações de peixes e de dois grupos de plantas da planície de inundação do alto rio Paraná. As informações genéticas foram acessadas com os marcadores moleculares RAPD e SPAR, ambos baseados em DNA. A espécie de peixe *Steindachnerina insculpta* é endêmica do alto rio Paraná, mas o fechamento da barragem de Itaipu foi introduzida a espécie *S. brevipinna*. Com a metodologia utilizada foi possível determinar que atualmente as duas espécies formam híbridos naturais raros, mas que provavelmente não retrocruzam com as espécies parentais. Assim, como não foi detectada efetiva quebra do isolamento, possivelmente as duas espécies coexistirão com as consequências da introdução, mas sem o risco iminente de extinção das populações parentais por miscigenação. Foi possível constatar que na planície de inundação *Gymnotus carapo* é frequentemente confundida com *G. sylvius*. As duas espécies podem ser facilmente identificadas com marcadores moleculares SPAR ou, com maior grau de dificuldade, pela análise cariotípica. Também foi obtida uma indicação preliminar de diferenciação genética de populações de *G. carapo* de lagoas distantes. Na planície ocorrem três grupos dentro de *Hoplias malabaricus* cf. que podem ser caracterizados molecularmente. Foram obtidos marcadores SPAR que identificam os três grupos. Foi possível demonstrar com marcadores RAPD e SPAR que, ao contrário do que se pensava, na espécie arbórea *Lonchocarpus guilleminianus* a reprodução assexuada não é a principal estratégia para ocupação de áreas desflorestadas. Os dados obtidos não forneceram indicações conclusivas sobre a identificação dos indivíduos morfologicamente intermediários entre as espécies *Eugenia moraviana* e *E. florida* da família Myrtaceae.

INTRODUÇÃO

O rio Paraná é o décimo maior do mundo em descarga e, de sua nascente, na confluência dos rios Paranaíba e Grande, percorre 4.695 Km até chegar à foz, no estuário do rio da Prata. Seu trecho superior, alto e parte do médio encontram-se em território brasileiro, drenando

uma área de 891.000 Km² (Paiva, 1982, citado por Agostinho & Zalewski, 1996).

O terço inferior do alto rio Paraná, onde está localizada a planície de inundação do alto rio Paraná, exhibe uma intrincada anastomose, com canais secundários, cursos inferiores de rios marginais e restritas áreas de várzeas. A planície de inundação do alto rio Paraná consiste no

último trecho livre de represamento do rio Paraná, em território brasileiro, após o fechamento da barragem de Porto Primavera (UHE Sérgio Motta). Possui uma extensão de 230 Km, largura de até 20 Km e é formada por diversas lagoas, riachos, pelo rio Baía, e os trechos inferiores dos rios Ivaí, Ivinheima, Amambá, e Iguatemi, além do rio Paraná (Agostinho & Zalewski, 1996). Na região do município de Guaíra-PR, o rio entra no reservatório de Itaipu onde estão submersos os saltos de Sete Quedas, barreira geográfica que delimitava os segmentos alto e médio do rio Paraná e representava uma barreira natural à dispersão de peixes (Agostinho & Zalewski, 1996).

O grau em que uma população pode ser delimitada de outras depende do nível de fluxo gênico entre elas (Futuyma, 1997) e alterações nesse fluxo gênico podem ser ocasionadas por alterações nas barreiras naturais.

Freqüentemente, as técnicas da biologia molecular podem ser empregadas como ferramentas para obtenção de informações no campo da ecologia. De modo geral, são utilizados marcadores moleculares para acessar o genoma de uma ou mais espécies e quantificar a variabilidade e determinar a estrutura genética das populações. Esta é uma abordagem recente, mas tem se mostrado eficiente em inferências e respostas para importantes questões ecológicas. Neste trabalho serão apresentados os resultados obtidos, com metodologias de genética molecular, de algumas populações de animais e plantas da planície de inundação do alto rio Paraná.

GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PEIXES

DIVERSIDADE E DISTÂNCIA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DO GÊNERO *Steindachnerina*

Modificações na ictiofauna podem ser causadas pela construção de reservatórios para geração de energia elétrica, seja pela eliminação de barreiras geográficas, modificando o padrão

de dispersão de várias espécies de peixes pela sua introdução nas áreas a montante da barragem (Agostinho, Julio Jr. & Borguetti, 1992), ou pela formação de novas barreiras. Com a construção da hidrelétrica de Itaipu, o obstáculo representado pelos Saltos de Sete Quedas foi deslocado 150 Km abaixo e mais de 15 espécies do médio e baixo Paraná invadiram o trecho superior, espécies estas que poderiam estar, até então, parcialmente isoladas.

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. O grau em que uma população pode ser delimitada de outras depende do nível de fluxo gênico entre elas (Futuyma, 1997) e alterações nesse fluxo gênico podem ser ocasionadas por alterações nas barreiras naturais.

O gênero *Steindachnerina* Fowler, 1906, é redefinido como uma unidade monofilética da família Curimatidae, ordem Characiformes (Vari, 1991). Este gênero é constituído por espécies de pequeno porte (Fink & Fink, 1978), iliófagas (Fugi, 1993) e representa um elo indispensável na cadeia alimentar, seja pelo aproveitamento de nutrientes contidos no sedimento ou constituindo recurso para as espécies ictiófagas.

Segundo Vari (1991), espécies de *Steindachnerina* estão distribuídas, em grande parte, pela América do Sul subtemperada e tropical. O mesmo autor (op. cit.) inclui 21 espécies no gênero, das quais três – *S. conspersa*, *S. brevipinna* e *S. insculpta* – ocorrem no rio Paraná nas porções baixa, inferior e superior, respectivamente, além de *S. corumbae*, espécie recentemente descrita por Pavanelli & Britski, (1999), que está restrita ao sistema do rio Paranaíba, bacia do alto rio Paraná, Estado de Goiás, Brasil.

Na área amostrada por este estudo, *S. insculpta*, endêmica a bacia do alto rio Paraná, ocorria como única espécie do gênero,

diagnosticada entre outros caracteres, pela ausência de mácula na porção basal da nadadeira dorsal. Na região abaixo desta, anteriormente isolada pelos saltos de Sete Quedas e atualmente pela usina hidrelétrica de Itaipu, ocorre uma espécie muito similar a *S. insculpta*, *S. brevipinna*, que apresenta uma mácula escura na base da dorsal. Nos últimos anos, após a construção da usina hidrelétrica de Itaipu, que possibilitou uma mistura entre as ictiofaunas isoladas pelos saltos de Sete Quedas durante sua contenção, começaram a aparecer espécimes com uma mácula escura bem evidente na nadadeira dorsal, bem como espécimes com mácula menos evidente, de pigmentação intermediária (Carla S. Pavanelli, comunicação pessoal). Em virtude dessas circunstâncias, poderiam estar ocorrendo cruzamentos entre indivíduos das populações que antes estariam isoladas pelo salto de Sete Quedas e se iniciando um processo de homogeneização genética dessas populações de peixes.

Inferências sobre fluxo gênico e variabilidade genética em populações naturais podem ser feitas através de diversas técnicas disponíveis para a detecção de polimorfismos, inclusive ao nível de sequência de DNA, principalmente após o desenvolvimento da tecnologia da reação da polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) (Mullis *et al.*, 1986) e de técnicas dela derivadas como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990). Essa técnica utiliza um *primer* único e curto com cerca de 10 a 11 bases para dirigir a reação de amplificação de vários segmentos de DNA simultaneamente, em diversos pontos do genoma. O número de locos obtidos por essa metodologia é ilimitado, uma vez que diversos *primers* podem ser utilizados e as sequências internas desses fragmentos vão desde sequências de cópia única até altamente repetitivas, o que dá um aumento na variação genética.

O objetivo proposto para este trabalho foi o de avaliar a variabilidade e a distância genética em populações do gênero *Steindachnerina* da

planície de inundação do alto rio Paraná, utilizando o marcador molecular RAPD, procurando obter indicações a respeito de uma provável homogeneização genética estar ocorrendo na região. Alterações genéticas induzidas no *pool* gênico das populações nativas poderiam ser irreversíveis e culminariam, a longo prazo, com a extinção das populações locais e formação de uma nova população híbrida na região. Associada à técnica RAPD, foi feita a análise morfológica de indivíduos de todas as populações.

MATERIAISE MÉTODOS

Coleta e preservação das amostras:

Foram coletados 19 espécimes de *Steindachnerina* com mácula escura, 19 sem mácula e 19 com mácula de pigmentação intermediária em vários pontos da planície de inundação do alto rio Paraná – PR, Brasil, incluindo lagoas, ressacos e rio Paraná (ver tópico "DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM"). Os espécimes foram fixados em álcool etílico comercial e estocados em freezer –20 °C.

Extração e quantificação de DNA

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989). Amostras de tecido muscular de $\pm 0,5 \text{ cm}^2$ foram retiradas de cada peixe, maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 500 μl de tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%), 500 μl de tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Spermidina 0,15 mM) pH 8,0 e 5 μl de proteinase K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) por 2 horas em banho-Maria com agitação a 37 °C. Em seguida, o DNA foi purificado por extração com fenol/clorofórmio (1:1, v:v) e clorofórmio, respectivamente, e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado, seguindo-se por incubação a -20 °C *overnight*. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 50 μl de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM)

contendo RNAase (20 µg/ml). A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (20 µg/100 ml), por meio de comparação com DNA de fago λ de concentração conhecida.

RAPD e análise dos dados

Inicialmente foi realizado um teste para a seleção dos oligonucleotídeos que foram utilizados no estudo, com *primers* (decâmeros) provenientes dos kits OPA, OPX, OPW e OPE (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), utilizando-se DNA de *Steindachnerina*. De um total de 80 primers testados, nove foram selecionados em função do perfil eletroforético que produziram. A mistura de reação de amplificação de cada um dos primers escolhidos consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, primer 0,46 µM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reação de *Taq*-polimerase (Gibco BRL), DNA (10 ng) e água suficiente para completar 11 µl. A amplificação do DNA se iniciou com um ciclo de desnaturação a 92 °C por 4 min., seguido por mais 40 ciclos de 1 min. a 92 °C, 1 min. 30 s a 40 °C e 2 min. a 72 °C. Imediatamente após o último ciclo de amplificação, a mistura de reação foi mantida durante 5 min. a 72 °C e resfriada durante 20 min. a 20 °C. Um controle negativo (com ausência de DNA molde) foi realizado em cada *set* de amplificações.

Aproximadamente 7 µl dos produtos de amplificação foram aplicados e separados em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídio (20 µg/100 ml) a 3 V.cm⁻¹ durante 4-5 horas. A visualização dos fragmentos foi feita sob luz ultravioleta e o tamanho pôde ser determinado comparando-se a distância migrada pelo fragmento desconhecido com as bandas de um marcador padrão (Ladder 100 pb – Gibco BRL).

Os indivíduos foram comparados dentro e entre populações, sendo as comparações feitas a partir de dados de ausência (0) e presença (1) de banda no gel para cada indivíduo. As medidas

de distância genética não tendenciosa de Nei com correção de Lynch e Milligan (1994) foram estimadas através do aplicativo computacional RAPDDIST e o índice de diversidade de Shannon (Zar, 1974) foi calculado pelo aplicativo computacional POPGEN versão 1.31. Uma matriz de distância entre todos os indivíduos, tomados dois a dois, foi obtida pelo complemento aritmético do índice de similaridade de Nei e Li (1979), utilizando o programa RAPDPLOT. Este coeficiente atribui grande importância à concordância positiva 11, o que o torna adequado para comparar itens diversos, como, por exemplo, diferentes espécies, onde a probabilidade de detecção da presença de bandas comuns é menor (Dias, 1998). Pelo fato da distância de Nei e Li não ser métrica, foi efetuada a correção de Lingoes (Legendre & Anderson, 1999) utilizando o operativo computacional DistPCoA.

A análise de agrupamento foi efetuada utilizando-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Methods of Arithmetic Means*) (Sneath & Sokal, 1973) através do programa PHYLIP versão 3.6.

Análise morfológica.

Dos espécimes utilizados para a análise genética foram selecionados 13 indivíduos com mácula, 7 intermediários e 13 sem mácula para as análises morfológicas. Os caracteres analisados foram comprimento padrão, comprimento da cabeça, comprimento do focinho, diâmetro do olho, distância interorbital, altura do corpo, comprimento pré-dorsal, escamas da linha lateral e séries de escamas da linha transversal acima e abaixo da linha lateral, alguns dos caracteres comumente utilizados em análises morfológicas e que estão descritos em Vari (1991), com exceção do número de escamas da linha lateral que aqui foram contadas no total e Vari (op. cit.) contou até o final da coluna vertebral.

RESULTADOS

RAPD. Todos os *primers* selecionados e analisados (OPE-09, OPW-04, OPW-06, OPW-

09, OPW-17, OPW-19, OPA-06, OPX-05, OPX-18) produziram diferentes padrões de fragmentos RAPD, embora *primers* individuais tenham diferido na quantidade de variação que eles detectaram. O número de bandas nítidas e reproduzíveis geradas por *primer* em todas as populações variaram de 8 a 16 e o tamanho desses produtos amplificados permaneceu entre 330-2400 pb. Dos 98 locos analisados para os 9 *primers* randômicos, 76 foram polimórficos (77,6%) e 22 monomórficos (22,4%), constantemente presentes em todos os

indivíduos. Embora em vários casos os alelos não estivessem presentes em todos os indivíduos, alguns foram únicos para uma dada população (Fig. 1). Dos 76 locos polimórficos, 27 foram exclusivos da população sem mácula e 31 exclusivos da população com mácula e intermediária, que apresentaram para todos os *primers* o mesmo padrão eletroforético e os mesmos alelos. Os resultados foram registrados na forma de uma matriz de dados de presença e ausência para 98 bandas RAPD.

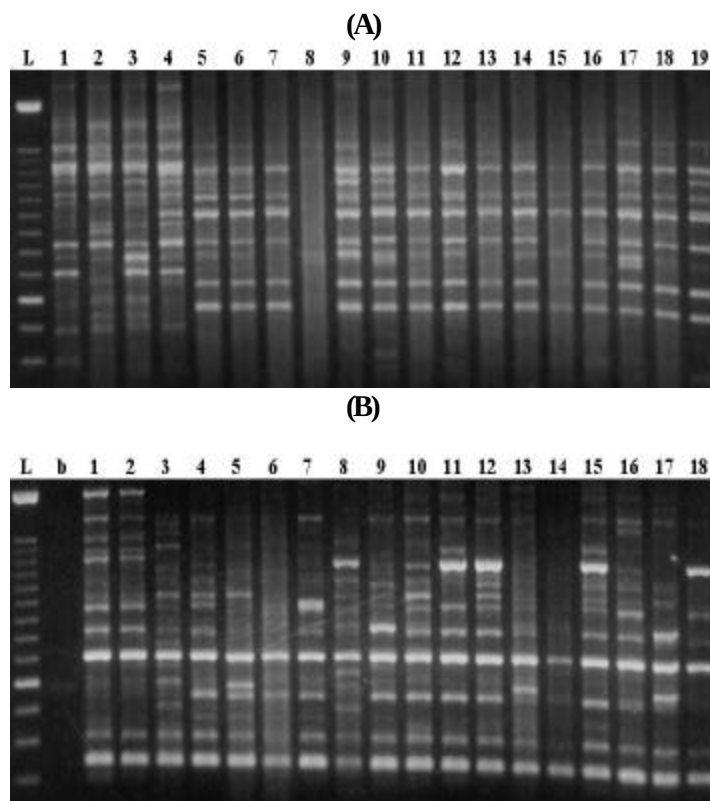


Figura 1. Perfis eletroforéticos de RAPD das populações de *Steindachnerina* da planície de inundação do alto rio Paraná. (A) Fragmentos amplificados com o *primer* OPX-18, a partir de indivíduos da população com mácula intermediária (1 a 4) e indivíduos da população sem mácula (5 a 19). Observar a presença de alelos exclusivos para cada população. (B) Fragmentos amplificados com o *primer* OPE-09. Todos os indivíduos (1 a 18) pertencem à população com mácula. Observar ocorrência de bandas polimórficas e monomórficas. Nos dois géis (A e B) a primeira coluna à esquerda (L) contém os fragmentos marcadores de peso molecular (Ladder 100 pb, Gibco BRL). No gel B, a segunda coluna à esquerda (b) representa o controle negativo.

Dados de distância genética não-enviesada de Nei, com correção para as frequências gênicas (Lynch & Milligan, 1994), calculadas para as três populações, estão apresentadas na Tabela 1. Os valores estimados mostram grande divergência genética entre a população sem mácula e as populações com mácula.

A estimativa de diversidade genética pelo índice de Shannon foi de 0,4457 ($\pm 0,2659$) considerando todos os indivíduos analisados e de 0,1221 ($\pm 0,2209$) para a população sem mácula, 0,1518 ($\pm 0,2600$) para a população com mácula e 0,1760 ($\pm 0,2768$) para a população intermediária. Considerando-se como uma única população os indivíduos com mácula e com mácula intermediária, o valor estimado é de 0,1793 ($\pm 0,2728$). Os dois grandes grupos apresentam valores similares de diversidade.

O dendrograma construído a partir dos valores de dissimilaridade agrupou os 57 espécimes em dois grandes grupos, um representado por todos os espécimes sem mácula e outro representado por todos os espécimes com mácula e com mácula intermediária (Figura 2). Esse modelo de diferenciação foi corroborado na representação gráfica da análise em coordenadas principais (Figura 3). Contudo, o espécime STSM-15 apresentou uma posição diferenciada dos demais grupos, compondo um terceiro grupo, na análise em coordenadas principais.

Morfologia

Além da presença ou ausência de mancha escura na nadadeira dorsal, o caráter morfomérico mais importante para separar exemplares das populações com mácula dos exemplares da população sem mácula, foi o número de escamas da linha lateral (38 a 40 e 40 a 42, respectivamente). Além desse, podem ser destacados o tamanho orbital (o diâmetro do olho estando contido de 2,8 a 3,5 vezes no comprimento da cabeça nos indivíduos com mácula e de 2,9 a 3,9 nos indivíduos sem

mácula), altura do corpo (sua altura contida de 2,8 a 3,4 vezes no comprimento padrão nos indivíduos com mácula e 3,1 a 3,6 vezes nos indivíduos sem mácula), séries de escamas da linha transversal acima da lateral (5,5 a 6,5 nos indivíduos com mácula e 6,0 a 6,5 nos indivíduos sem mácula) e comprimento do focinho (contido de 3,2 a 4,4 vezes na altura do corpo nos indivíduos com mácula e de 3 a 4 vezes nos indivíduos sem mácula).

O espécime STSM-15, sem mácula, apresentou algumas características morfológicas que o enquadrariam na população com mácula, como o número de escamas da linha lateral (38) número de escamas da linha transversal abaixo da linha lateral (5,5) e proporção da altura do corpo em relação ao comprimento padrão (2,94).

DISCUSSÃO

Variações interpopulacionais e interespecíficas, em peixes, têm sido detectadas através da técnica RAPD, principalmente em função da grande quantidade de *primers* disponíveis e que podem ser utilizados, cada um detectando variações em algumas regiões do genoma (Bardakci & Skibinski, 1994). A análise pode ser mais sensível que métodos mais tradicionais como isoenzimas ou mtDNA, uma vez que envolve regiões não codantes, neutras, as quais permitem altas taxas de mutação e a presença de diferentes alelos em cada loco (Williams, Kazianis & Walter, 1998; Cagigas *et al.*, 1999; Mamuris, Stamatis & Triantaphyllidis, 1999).

Neste estudo a técnica tem discriminado, sem conhecimento prévio do genoma analisado, duas diferentes populações de peixes, indubitavelmente diferentes espécies em decorrência das estimativas de diversidade e distância genética apresentadas.

Os fragmentos observados nos 57 indivíduos mostraram alto grau de polimorfismo, e grande parte deles foram exclusivos de uma ou outra população.

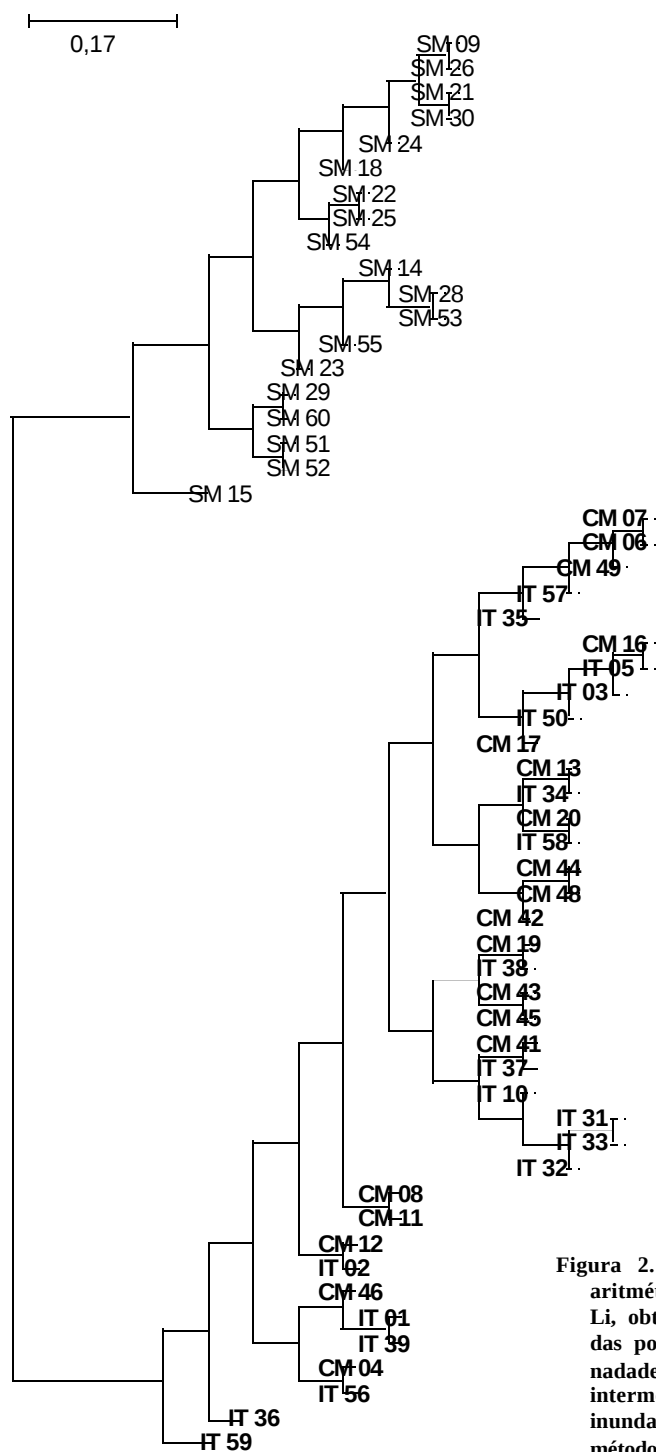


Figura 2. Dendrograma baseado nos complementos aritméticos dos coeficientes de similaridade de Nei e Li, obtidos com marcadores RAPD. Os indivíduos das populações de *Steindachnerina* com mácula na nadadeira dorsal (CM), com mácula de pigmentação intermediária (IT) e sem mácula (SM) da planície de inundação do alto rio Paraná, foram agrupados pelo método UPGMA.

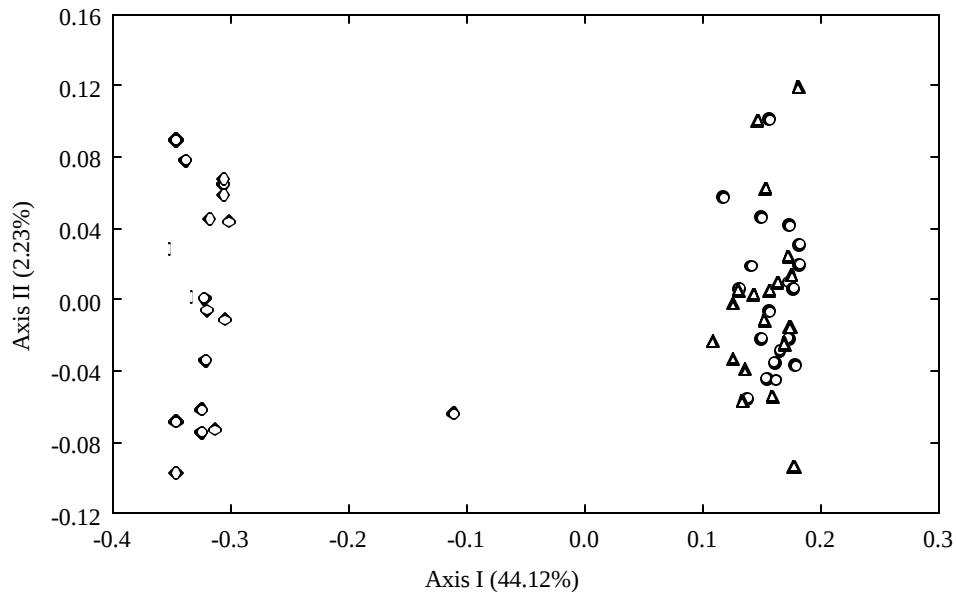


Figura 3. Gráfico dos dois primeiros eixos da análise em coordenadas principais de indivíduos com mácula na nadadeira dorsal ($\circ$), sem mácula ($\diamond$) e com mácula de pigmentação intermediária (Δ) da planície de inundação do alto rio Paraná. A análise foi efetuada com a correção pelo método de Lingoes, a partir da matriz de complementos aritméticos dos coeficientes de similaridade de Nei e Li, obtidos com marcadores RAPD.

Tabela 1. Matriz da distância genética não tendenciosa de Nei, com correção de Lynch e Milligan, entre populações de *Steindachnerina* com mácula na nadadeira dorsal (CM), com mácula de pigmentação intermediária (IT) e sem mácula (SM), da planície de inundação do alto rio Paraná.

Populações	Distância Genética de Nei		
	CM	IT	SM
CM	0,0000		
IT	0,0092	0,0000	
SM	0,7288	0,6914	0,0000

Os valores de distância genética de Nei entre ambas indicam que as populações de *Steindachnerina* da planície de inundação do alto rio Paraná estão representadas por duas espécies, uma vez que valores superiores a 0,3 caracterizam grande parte delas (Thorpe, 1982). Valores inferiores, como por exemplo 0,162, já foram encontrados para espécies do mesmo gênero com estudos enzimáticos (Thorpe & Solé-Cava, 1994). Em contrapartida, a baixa distância observada entre as populações com mácula e intermediária mostram que, além dessas populações pertencerem à mesma espécie, elas estão homogeneizadas geneticamente. A distância de Nei leva em conta tanto os locos polimórficos como os monomórficos e é apropriada para casos de processos evolutivos longos, onde a divergência entre as populações ocorreu por deriva genética ou mutação (Weir, 1990), sendo que seu valor é proporcional ao tempo de divergência e à taxa de substituição gênica por locos e por geração (Dias, 1998).

A análise morfológica permitiu detectar algumas diferenças entre as populações, e, de acordo com os dados morfométricos e merísticos, os espécimes com mácula encontrados na região pertencem à espécie *S. brevipinna*, descrita por Vari (1991) na porção inferior do rio Paraná. Essa espécie deve ter colonizado a região acima de Sete Quedas durante a construção do reservatório de Itaipu, em 1982, quando algumas espécies de peixes transpuseram a barreira geográfica e obtiveram sucesso acima (Agostinho, Júlio Jr. & Borguetti, 1992). Em função da diversidade intrapopulacional e da percentagem de locos polimórficos encontrada para essa espécie (34,7%), semelhante e inclusive superior à população representada por *S. insculpta* (29,6%), há indícios de que essa introdução possa ter ocorrido com um grande número de indivíduos, os quais foram suficientes para, apesar do isolamento geográfico, manter a diversidade genética da população original (a jusante de Itaipu). A espécie sem mácula,

identificada como *S. insculpta*, e confirmada pela análise morfológica, é endêmica a região a montante de Itaipu (Vari, 1991).

Como as populações estão fortemente diferenciadas geneticamente, o fluxo gênico entre elas é pouco provável, uma vez que elas exibem algumas diferenças fixadas. No entanto, um único indivíduo (STSM-15) apresentou um padrão de bandas desigual, apresentando alelos de ambas populações, em função do *primer* utilizado, assim como características morfológicas correspondentes aos dois grupos ou a nenhum deles, como no caso do número de escamas da linha transversal abaixo da linha lateral. Na análise em coordenadas principais, este espécime compôs um terceiro agrupamento, posicionando-se de forma intermediária entre os dois grandes conjuntos formados pelas populações com e sem mácula. Estes fatos levam à suposição de que talvez estejam ocorrendo cruzamentos entre os indivíduos das diferentes populações, resultando em híbridos, que herdaram alguns alelos típicos das espécies progenitoras. As espécies de Curimatidae, já citadas, apresentam uma alta similaridade para a macroestrutura cariotípica, representada pela presença de $2n=54$ cromossomos de dois braços (Venere & Galetti Jr., 1989). Apesar de pequenas variações interespecíficas ao nível de bandamentos cromossômicos (Venere & Galetti op. cit.), que podem inviabilizar a progênie dos indivíduos híbridos, o rompimento do isolamento geográfico pode levar, como neste caso, a formação de híbrido natural como o indivíduo STSM-15. Esses híbridos podem ser inviáveis devido a diferenças cromossômicas ou gênicas (Futuyma, 1997) e isso explicaria o baixo número de indivíduos que poderiam ser encontrados na região. Considerando a esterilidade uma característica desses híbridos, não haveria a possibilidade de retrocruzamentos e alteração na composição genética das populações nativas, bem como homogeneização.

Conforme os resultados obtidos, *S. brevipinna* foi introduzida na planície de inundação do alto rio Paraná e ela pode estar

competindo com as populações nativas por espaço, recursos alimentares e locais de desova. Novas amostragens devem ser realizadas com o intuito de investigar, espacial e temporalmente, como essas duas espécies do gênero *Steindachnerina*, há 20 anos ocorrendo sintopicamente na região, estão explorando o mesmo habitat, partilhando recursos e se de alguma forma, uma das espécies está predominando, talvez por alguma vantagem adaptativa. As possíveis perturbações que essa nova população pode ocasionar na comunidade biótica local podem, a longo prazo, trazer efeitos irreversíveis e particularmente importantes do ponto de vista conservacionista.

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Gymnotus* (PISCES- GYMNOTIFORMES)

O gênero *Gymnotus* possui ampla distribuição geográfica. Estando presente desde Costa Rica na América Central até o rio de La Plata, na Argentina (Borin & Júlio Jr, 1994). Ele é o único gênero da família Gymnotidae. Pertence ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, superclasse Gnathostomata, classe Actinopterygii, subclasse Neopterygii, divisão Teleostei, subdivisão Euteleostei, superordem Ostariophysi, ordem Gymnotiformes (Nelson, 1994).

As espécies deste gênero habitam geralmente ambientes lênticos, 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).

São conhecidas quinze espécies nominais deste gênero (Fernandes-Matioli, 1999). A grande semelhança morfológica entre as espécies de *Gymnotus* tem ocasionado a identificações equivocadas, denominando como

G. carapo espécies que na verdade não o são. 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 indica a existência de mais de uma espécie.

Agostinho & Júlio Jr. (1999), afirmam que existem cerca de 250 espécies de peixes na planície de inundação do alto rio Paraná. Entretanto existem diversos problemas de identificação, o que poderia aumentar este número.

Algumas técnicas genético-bioquímicas e genético-moleculares, tem auxiliado na separação e identificação de espécies de peixes. Dentre essas técnicas, pode-se citar o RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*) (Partis & Wells, 1996; Callejas & Ochando, 1998, Albert et al., 1999), e a técnica de SPAR (Single Primer Amplification Reaction) (Gupta et al., 1994; Albert et al., 1999; Fernandes-Matioli, 2000). Ambas as técnicas são variações do PCR (*Polimerase Chain Reaction*) descrita por Mullis e Faloona (1986).

A técnica de RAPD, varia da de PCR por utilizar *primers* arbitrários de 10 a 15 pares de bases que amplificam regiões dentro os limites de seu flaqueamento (Williams, et al., 1990). A técnica de SPAR utiliza *primers* que se ligam as regiões microssatélites do DNA, amplificando a região que se encontra entre os blocos de microssatélites (Gupta et al., 1994).

A técnica de SPAR foi utilizada por Albert et al (1999) como mais uma ferramenta para identificar a espécie *G. sylviu*. Fernandes-Matioli (2000), utilizando-se dessa técnica estabeleceu um padrão de bandas espécie-específicos para cinco espécies de *Gymnotus*: *G. carpo*, *G. sylvius*, *G. inaequilabiatus*, *G. anguillares* e *G. pantherinus*.

Os citótipos de *Gymnotus* encontrados por Borin & Júlio Jr. (1994), que coincidem com os descritos por Fernandes-Matioli (2000) para *G. carapo* ($2n=54$) e *G. sylvius* ($2n=40$), permitem levantar a hipótese de que existem pelo menos

duas espécies de *Gymnotus* na planície de inundação do alto rio Paraná.

O objetivo deste trabalho é separar e identificar essas espécies através das técnicas de RAPD e SPAR.

MATERIAISE MÉTODOS

As coletas foram realizadas em quatro lagoas na planície de inundação do alto rio Paraná (ver tópico "DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM"). Um total de 58 espécimens foram coletados, sendo 18 na Lagoa do Pernambuco - Rio Paraná (PA) (S 46° 26', W 19° 56'), 15 na Lagoa dos Patos (S 49° 33', W 53° 33'), 01 na Lagoa do Jacaré Rio Ivinheima (IV) (S 47° 2', W 53° 29'), e 24 na Lagoa do Pernambucano - Rio Baía (BA) (S 39° 48', W 53° 12'). Amostras de músculo foram coletadas de cada espécime, fixadas em álcool comercial e estocadas.

A extração do DNA total, foi feita de acordo com a proposta de Whitmore *et al.* (1992). Fragmentos de tecido muscular preservados em álcool comercial 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 ressuspenso em 30 µL de tampão 1/10 TE (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA) + RNase (20 µg/mL). Logo após foi incubado em banho-maria a 37°C por uma hora para a digestão do RNA.

A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada através da comparação com o DNA do fago λ de concentração conhecida, por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%

Todos os indivíduos foram analisados através da amplificação com o *primer* GGAC(4), para a identificação das espécies. A mistura de reação utilizada tinha um volume total de 13 µL, contendo 10 ng DNA, 5 pmol do *primer*, 1 U

Taq-DNA polimerase (Gibco BRL), 200 µM de cada dNTP, 2 mM MgCl e tampão (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl). As condições de amplificação foram as utilizadas por Albert *et al.* (1999), com cinco ciclos iniciais de 45 s a 94°C, 60 s a 51°C e 60 s a 72°C e 30 ciclos de 45 s a 94°C, 60 s a 48°C e 60 s a 72°C. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,4% coradas com brometo de etídio, submetido a campo elétrico de 5 V cm⁻¹ e fotografadas sob luz ultravioleta.

Entre os indivíduos identificados 47 foram analisados pela técnica de RAPD. A amplificação do DNA foi baseada nas condições propostas por Bardakci e Skibinski (1994), com mistura de reação de volume total igual a 13 µL, contendo 10 ng DNA, 0,46 µM de cada *primer*, 1 U Taq-DNA polimerase (Gibco BRL), 200 µM de cada dNTP, 2 mM MgCl e tampão (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl). O termociclador foi programado segundo as condições propostas por Almeida (1998), com uma etapa inicial de 4 min a 92°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min 30 s a 40°C e 2 min a 72°C, com uma etapa final de 5 min a 72°C. Sessenta *primers* dos kits OPA, OPW e OPX (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) foram testados para a seleção dos oligonucleotídeos que foram utilizados neste trabalho.

As amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1,4% diluído em TBE com brometo de etídio a 0,02% para a visualização e comparação dos fragmentos amplificados. Foram escolhidos aqueles que apresentaram maior número de bandas. Os padrões de RAPD foram comparados dentro e entre os locais de coleta. Para cada indivíduo obteve-se um padrão eletroforético a partir de cada *primer*, detectando-se a presença ou ausência de bandas no gel que corresponderiam aos fragmentos de RAPD específicos. As comparações foram realizadas a partir do conhecimento da presença (1) ou ausência (0) de fragmentos RAPD para cada indivíduo.

A distância não tendenciosa de Nei com correção de Lynch e Milligan (1994) entre *G. carapo* e *G. sylvius* foi calculada com o aplicativo computacional RAPDDIST (Blank & Antolin, 1997). A matriz de distância foi obtida pelo complemento aritmético do índice de similaridade de Nei e Li (1979) entre todos os indivíduos, tomados dois a dois, das populações de *G. carapo* e *G. sylvius*, utilizando o programa RAPDplot (Black, B., 1997). Foi efetuada a correção de pelo método de Lingoies (legendre & Anderson, 1999) utilizando o operativo computacional DistPcoA (Legendre & Anderson, 1998). A análise de agrupamento foi efetuada utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Methods of Arithmetic means*) (Sneath e Sokal, 1973), utilizando os programas RAPDPLOT 3.0 (Black, 1997) e PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1993).

RESULTADOS

Foram coletados 58 espécimens de quatro lagoas da planície de inundação do alto Rio

Paraná. Sendo 1 da lagoa do Jacaré e 15 da lagoa do Patos no Sistema Ivinheima, 24 da lagoa do Pernambucano, no Sistema Baía, e 18 da lagoa do Pernambuco, no Sistema Paraná (Ilha Mutum).

As bandas obtidas pela técnica de SPAR obedeceram três padrões: um indivíduo apresentou uma banda de aproximadamente 1000 pb e outra banda de aproximadamente 350 pb e entre essas bandas, não muito nítidas, um banda de aproximadamente 700 pb e outra de 450 pb. Este espécime foi identificado como *Gymnotus inaequilabiatatus* cf.

O segundo padrão foi apresentado por 43 indivíduos em que se visualiza duas bandas: uma de 700 outra de 1400 pb que foram identificados como *Gymnotus carapo* cf. O último padrão de bandas foi encontrado em 14 espécimens e apresentava três bandas: uma com 650 pb, a segunda com 1000pb e a última com aproximadamente 1700 pb. Esse grupo foi identificado como *Gymnotus sylvius*(Fig.4).

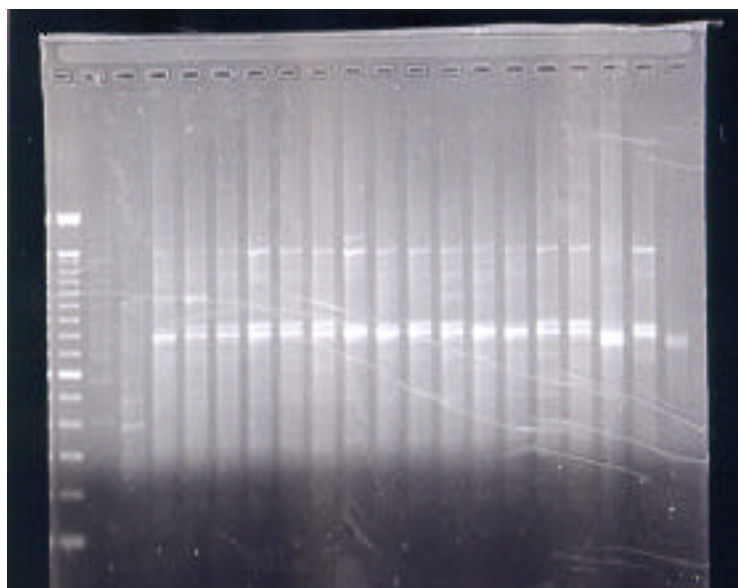


Figura 4. Padrões eletroforéticos de espécies de *Gymnotus*, obtidos pela amplificação. Via PCR, com o primer GGAC(4). Linha1: Ladder 100 pb (Gibco BRL); Linha 2: branco; linha 3: *G. inaequilabiatatus* cf.; linhas 4-14 e 16: *G. carapo* cf.; linhas 15 e 17: *G. sylvius*.

Entre os *G. carapo* cf. 14 eram da lagoa do Patos, 15 da lagoa do Pernambucano e 14 da lagoa do Pernambuco. Entre os *G. sylvius*, 1 era da lagoa dos Patos, 9 da lagoa do Pernambucano e 4 da lagoa do Pernambuco.

O espécime coletado na lagoa do Jacaré não foi analisado através de RAPD. Os outros indivíduos foram separados em dois grupos que foram identificados com a técnica de SPAR. Os padrões de bandas encontrados coincidem com os padrões apresentados por Fernandes-Matioli (2000) como *G. carapo* cf. e *G. sylvius*.

Dez primers foram selecionados de acordo com o número de bandas obtidos (Tabela 2). Os fragmentos obtidos variaram entre 440 e 2500 pb. Foram amplificados 122 locos, sendo 110 polimórficos e 12 monomórficos.

A estimativa da distância não tendenciosa de Nei, com correção de Lynch e Milligan (1994) entre *G. carapo* cf. e *G. sylvius* foi de 0,4772.

A diversidade genética de Nei para *G. carapo* cf. foi de 0,2668 e para *G. sylvius* 0,1869.

A matriz de distância, entre as populações de *G. carapo* cf. e *G. sylvius*, permitiu separar as duas populações em dois grupos distintos. Isso pode ser visualizado no dendrograma (Figura 05) e no gráfico de coordenadas principais (Figura 06).

DISCUSSÃO

Comparando os padrões de bandas obtidos com os determinados por Albert *et al.* (1999), quatorze dos indivíduos coletados apresentam exatamente as mesmas bandas marcadoras descritas para a espécie *G. sylvius*.

Um dos indivíduos apresenta um padrão similar ao de *G. inaequilabiatus* (Fernandes-Matioli, 2000), como apenas um indivíduo foi coletado e o resultado observado em todas as repetições foi de baixa qualidade, não se pode afirmar com certeza a espécie deste indivíduo.

Deve-se considerar ainda que o padrão estabelecido por Fernandes-Matioli (2000) utilizou apenas 4 indivíduos de duas localidades consideradas por ela como próximas.

Em relação aos demais indivíduos o padrão de bandas observado coincide com o apresentado por Fernandes-Matioli (2000) para *G. carapo*, entretanto não coincidindo com o que ela considera como as bandas marcadoras. Neste caso, uma das bandas obtidas é considerada pela autora como banda marcadora, a outra como banda polimórfica.

Fernandes-Matioli, considera a espécie *G. carapo* como a de maior distribuição geográfica dentro do gênero. E encontrou sete padrões polimórficos para esta espécie. Entretanto em seu trabalho não constavam indivíduos da bacia do Paraná localizada abaixo da barragem de Porto Primavera (Usina Hidrelétrica Sérgio Motta). Dessa forma é possível sugerir que apesar da diferença nas bandas marcadoras, esses indivíduos também sejam *G. carapo*, e que esse polimorfismo é resultado das diferenças populacionais e não específicas.

O fato de nenhuma das espécies ter apresentado padrões polimórficos quando analisados pela técnica de SPAR, poderia indicar a perda de variabilidade genética por deriva genética. No entanto, esta suposição não é confirmada pelos valores observados do índice de diversidade genética obtidos com RAPD.

Com exceção do indivíduo identificado como *G. inaequilabiatus*, os demais indivíduos foram encontrados em simpatria e sintopia. Fernandes-Matioli também encontrou populações de *G. carapo* e *G. sylvius* em simpatria e sintopia em três localidades.

Tanto *G. carapo* quanto *G. sylvius* não são descritas para esta região da bacia do rio Paraná. Sendo que *G. inaequilabiatus* é descrita para a região do Paraná Inferior (Fernandes-Matioli, 2000).

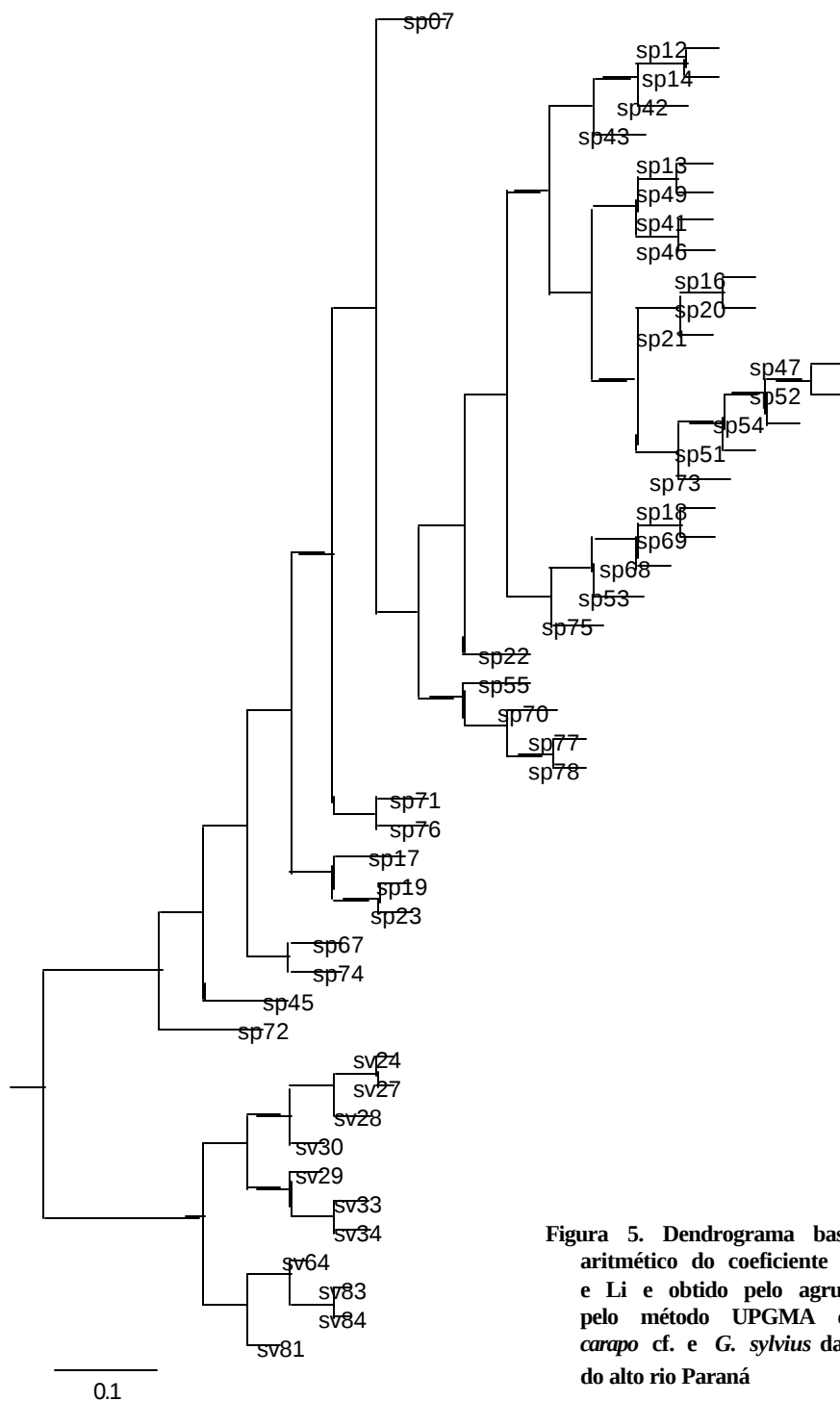


Figura 5. Dendrograma baseado no complemento aritmético do coeficiente de similaridade de Nei e Li e obtido pelo agrupamento de indivíduos pelo método UPGMA das espécies *Gymnotus carapo* cf. e *G. sylvius* da planície de inundação do alto rio Paraná

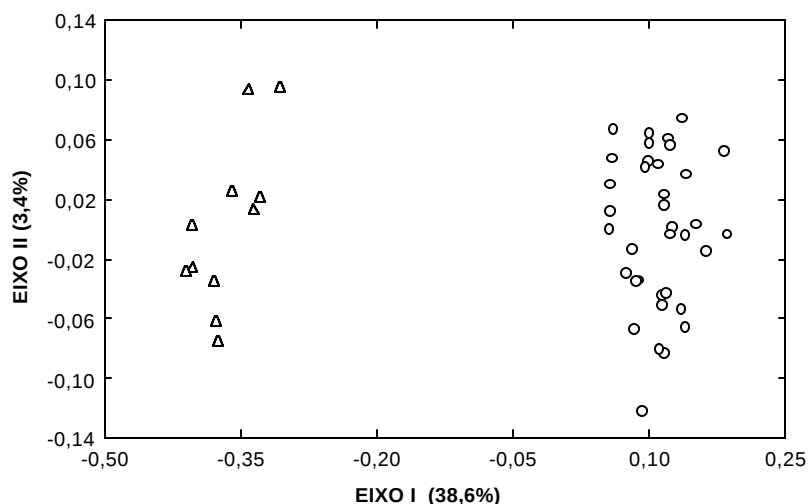


Figura 6. Gráfico da análise em coordenadas principais de indivíduos *Gymnotus carapo* (●) e *G. sylvius* (▲) da planície de inundação do alto rio Paraná. A análise foi efetuada com a correção pelo método de Lingoes, a partir da matriz de complementos aritméticos do coeficiente de Nei e Li, obtidos com marcadores RAPD.

Tabela 2. *Primers* utilizados nas reações de RAPD.

<i>Primer</i> (Operon Technologies Inc.)	5' → 3'
OPA07	GAAACGGGTG
OPA09	GGGTAACGCC
OPW03	GTCCGGAGTG
OPW06	AGGCCCAGTG
OPW07	CTGGACGTCA
OPW19	CAAAGCGCTC
OPX04	CCGCTACCGA
OPX05	CCTTTCCTC
OPX11	GGAGCCTCAG
OPX13	ACGGGAGCAA

Os dados obtidos através da técnica de RAPD, que foi utilizada apenas em *G. carapo* e *G. sylvius*, foram coincidentes com os obtidos pela técnica de microssatélite. Foi possível separar claramente as duas espécies através das diferentes formas de análises estatísticas.

A identificação das espécies de *Gymnotus* na planície de inundação do alto rio Paraná complementa os estudos da diversidade da ictiofauna desta região. Também confere consistência às análises de variabilidade genética dessas populações dentro da planície.

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Gymnotus carapo*. (PISCES - GYMNOTIFORMES) AVALIADA PELA UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD.

A ordem Gymnotiformes possui ampla distribuição geográfica. Estando presente desde o rio La plata, na Argentina até o rio San Nicolas, no México (Albert, 1995). É classificada como ordem irmã dos Siluriformes (Nelson, 1994).

Os Gymnotiformes constituem um importante componente da ictiofauna nas áreas alagáveis da Amazônia. Sua capacidade de eletrolocalização e eletrocomunicação são relativamente compreendidos. Entretanto a ecologia, abundância e distribuição das espécies são pouco conhecidas (Crampton, 1996).

Maggo-Leccia (1994) divide em seis famílias a ordem Gymnotiformes: Sternopygoidei, Apterodontidae, Rhamphichthyidae, Hypopomidae, Gymnotidae e Electrophoridae. A família Gymnotidae possui um único gênero: *Gymnotus*, com quinze espécies nominais (Albert, 1999). A espécie tipo é a *G. carapo*, considerada a que possui mais ampla distribuição geográfica (Fernandes-Matioli, 2000).

Os *Gymnotus* são peixes não migradores (Agostinho & Júlio Jr., 1999), que geralmente habitam ambientes lênticos, de águas escuras e fundo lodoso, com presença de pedras e raízes (Barbieri, 1981; Fernandes-Matioli, 2000). Pelo fato de não serem migradores espera-se que a diferença das populações dentro da mesma bacia sejam maiores do que as diferenças entre as populações de bacias diferentes.

Na região Amazônica os *Gymnotus* estão presentes em lagoas de áreas alagáveis (Crampton, 1996). Da mesma forma estão presentes nas lagoas da planície de inundação do alto rio Paraná, além de serem encontrados também em alguns canais, nos rios Baía e Ivinheima, e raramente na calha principal do rio Paraná (Borin & Júlio Jr., 1994; Agostinho & Júlio Jr, 1999).

A planície de inundação do alto rio Paraná consiste no último trecho livre de represamento do rio Paraná, em território brasileiro, após o fechamento da barragem de Porto Primavera (UHE Sérgio Motta). Possui uma extensão de 230 Km, largura de até 20 Km e é formada por diversas lagoas, riachos, pelo rio Baía, e os trechos inferiores dos rios Ivaí, Ivinheima, Amambá, e Iguatemi, além do rio Paraná (Agostinho & Zalewski, 1996).

O pulso de inundação é força de homogeneização de diversos fatores limnológicos e representa uma importante força que atua sobre as comunidades aquáticas da planície (Thomaz *et al.*, 1997). Em relação a ictiofauna o pulso de inundação controla dentro da planície a diversidade específica e a densidade de cada espécie. Ele aumenta o espaço vital, a disponibilidade de abrigo e alimento, a produtividade e altera as relações de competição e predação da comunidade. Além disso o período de vazante faz com que muitas espécies de peixes saiam das águas rasas voltando à calha do rio ou confinando-se nas lagoas permanentes. (Agostinho e Júlio Jr., 1999).

As técnicas genético-bioquímicas e genético-moleculares propiciam ferramentas para a análise da variabilidade genética de populações. Entre essas técnicas está o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) desenvolvida por Williams *et al.* e Welsh & McClelland independentemente em 1990. Essa técnica é uma variação da PCR (*Polimerase Chain Reaction*) descrita por Mullis e Faloona (1986).

A técnica de PCR permitiu que se gerasse *in vitro* grandes quantidades de DNA. Entretanto ela é limitada pela utilização de *primers* específicos, que necessitam do conhecimento prévio das regiões flangeadoras do segmento de DNA que se deseja amplificar. O RAPD elimina essa limitação utilizando *primers* arbitrários com 10-15 pares de bases que amplificam segmentos do genoma que se localizam entre a regiões flangeadas por esses *primers*.

O estudo da variabilidade genética do *Gymnotus carapo* cf. e da distância genética entre diferentes lagoas na planície de inundação do alto rio Paraná permitirá avaliar a influência do pulso de inundação na homogeneização dessas populações.

A despeito do fato do *Gymnotus carapo* cf. ser uma espécie não migradora, o fato do pulso de inundação transformar a planície em

praticamente um só corpo d'água, permite levantar a hipótese de que as populações da planície têm alta homogeneidade.

O objetivo deste trabalho foi medir a variabilidade genética e a distância genética das populações de *Gymnotus carapo* cf diferentes lagoas da planície de inundação do alto rio Paraná através da técnica de RAPD.

MATERIAISE MÉTODOS

As coletas foram realizadas em três lagoas da planície de inundação do alto rio Paraná: Lagoa do Pernambuco - Rio Paraná (PA) (S 46° 26', W 19° 56'), Lagoa dos Patos - Rio Ivinheima (IV) (S 49° 33', W 53° 33'), e Lagoa do Pernambucano - Rio Baía (BA) (S 39° 48', W 53° 12') (ver tópico "DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM"). A espécie dos indivíduos foi previamente identificado através da técnica de microssatélite (Castro, 2001). Foram utilizados doze indivíduos de cada população. Amostras de músculo serão coletadas de cada espécime, fixadas em álcool comercial e estocadas.

A extração do DNA total, foi feita de acordo com a proposta de Whitmore *et al.* (1992). Fragmentos de tecido muscular preservados em álcool comercial 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 será 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 1/10 TE (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDT) + RNase (20 µg/mL) e incubadas em por uma hora em banho-maria para digestão do RNA.

A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada através da comparação com o DNA do fago λ de concentração conhecida, por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%

Comparou-se as amostras das três populações através da técnica de RAPD. A amplificação do DNA foi baseada nas condições propostas por Bardakci e Skibinski (1994), com mistura de reação de volume total igual a 13 µL, contendo 10 ng DNA, 0,46 µM de cada *primer*, iU Taq-DNA polimerase (Gibco BRL), 200 µM de cada dNTP, 2 mM MgCl e tampão (20 mM Tris-HCl pH8,0; 50 mM KCl).

O termociclador foi programado segundo as condições propostas por Almeida (1998), com uma etapa inicial de 4 min a 92°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min 30 s a 40°C e 2 min a 72°C, com uma etapa final de 5 min a 72°C.

Sessenta *primers* provenientes dos *kits* OPA, OPW e OPX (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) foram testados para a seleção dos oligonucleotídeos que foram utilizados neste trabalho.

As amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1,4% diluído em TBE com brometo de etídio à 0,02% para a visualização e comparação dos fragmentos amplificados.

Os padrões de RAPD foram comparados dentro e entre os locais de coleta. Para cada indivíduo obteve-se um padrão eletroforético a partir de cada *primer*, detectando-se a presença ou ausência de bandas no gel que corresponderiam aos fragmentos de RAPD específicos. As comparações foram realizadas a partir do conhecimento da presença (1) ou ausência (0) de fragmentos RAPD para cada indivíduo.

Foi calculada a estatística F'_{ST} de Lynch (1994, que é semelhante à estatística F_{ST} de Wright. O valor de F'_{ST} varia de zero até 1, representando completa homogeneidade até completa subdivisão entre as amostras respectivamente. Para o cálculo da significância do F_{ST} foi utilizado o teste de χ^2 (Workman e Niswander, 1970).

A distância genética D foi calculada de acordo com a distância não tendenciosa de Nei (1978), e as frequências das distâncias gênicas foi corrigida pelo método de Lynch e Milligan (1994).

Os aplicativos computacionais utilizados para o cálculo das distâncias genéticas e do fluxo gênico foram: RAPDDIST e RAPDF_{ST} (Black & Antolin, 1997; Black, 1997).

Resultados

Foram analisados 36 indivíduos de três lagoas na planície de inundação do alto rio Paraná - 12 da Lagoa dos Patos, 12 da Lagoa do Pernambuco e 12 Lagoa do Pernambucano. Sessenta *primers* foram testados dos *kits* OPA, OPW e OPX (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA). Foram utilizados 10 *primers* destes *kits* (Tabela 3).

Obteve-se 77 locos polimórficos e 33 locos monomórficos. O tamanho dos fragmentos gerados variou entre 350 e 3000 pb.

Os valores de F_{ST} , utilizando a estatística de Lynch e Milligan (1994), variaram de 0,127 a 0,179. Pelo teste do χ^2 os valores foram

significativo entre todas as populações ao nível de 5%. Estes valores não foram significativos ao nível de 1% entre as populações da lagoa dos Patos e da lagoa do Pernambucano, sendo significativo entre as demais (Tabela 4).

Tabela 3. *Primers* utilizados nas reações de RAPD.

<i>Primer</i> (Operon Technologies Inc.)	5' → 3'
OPA07	GAAACGGGTG
OPA09	GGGTAACGCC
OPW03	GTCCGGAGTG
OPW06	AGGCCCGATG
OPW07	CTGGACGTCA
OPW19	CAAAGCGCTC
OPX04	CCGCTACCGA
OPX05	CCTTTCCCTC
OPX11	GGAGCCTCAG
OPX13	ACGGGAGCAA

A distância genética D variou de 0.0533 a 0.0738. Sendo que entre a população da lagoa dos Patos e da lagoa do Pernambucano foi de 0.0533, da lagoa do Pernambucano e da lagoa do Pernambuco foi de 0.0738 e da lagoa dos Patos e da lagoa do Pernambuco de 0.0638 (Tabela 5).

Tabela 4. Estimativa do índice de fixação (F_{ST}), resultado do teste de significância (χ^2) de F_{ST} e número médio de migrantes por geração (Nm) entre as populações de *G. carapo* cf. Lagos dos Patos (IV); lago do Pernambucano (BA); lagoa do Pernambuco (PA) na planície de inundação do alto rio Paraná.

	F_{ST}	Teste de significância de F_{ST}		Nm
		χ^2	P(GL=1)	
IV – BA	0,127 (0,162)	6,096	<0,05	1,7
IV – PA	0,179 (0,186)	8,592	<0,01	1,1
BA – PA	0,179 (0,189)	8,592	<0,01	1,1

Os números entre parênteses representam o desvio padrão

Tabela 5. Distância genética D entre populações de *G. carapo* cf. *Llagos dos Patos* (IV); lagos do Pernambucano (BA); lagoa do Pernambuco (PA) na planície de inundação do alto rio Paraná.

Populações	Distância Genética de Nei		
	IV	BA	PA
IV	0,0000		
BA	0,0533	0,0000	
PA	0,0738	0,0683	0,0000

O índice médio de diversidade da espécie foi de 0,2668.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos através da técnica de RAPD, indicam o isolamento das populações de *G. carapo* cf. Apesar de ser uma espécie não migradora, a hipótese inicial era de que o pulso de inundação promoveria uma dispersão dos indivíduos de forma a homogeneizar as populações da planície. Entretanto o que foi obtido demonstra que esse evento de dispersão não ocorre

Os resultados de F_{ST} obtidos demonstram distâncias genéticas significativas entre as três lagoas, sugerindo que a população de *Gymnotus* na planície está geneticamente estruturada. Bialawski e Pumo (1997) obtiveram valores de F_{ST} entre 0,39 e 0,52 para populações de *Morone saxatilis* da Costa do Atlântico, Sekine (2000) obteve valores entre 0,030 e 0,112 para populações de *Pseudoplatystoma corruscans* da bacia do rio Paraná. Tanto Bialawski e Pumo (1997) quanto Sekine (2000) concluem que há significativa diferenciação genética entre as populações por eles estudadas.

Os valores de N_m , derivados de F_{ST} , equivalem ao número de migrantes por geração, informando também a diferenciação entre as população. Esses valores acima de 1 podem indicar que o fluxo gênico é um fator atuante contra a diferenciação dessas populações (Spieth,

1974). Dessa forma pode-se afirmar que apesar de significativamente diferentes, essas populações ainda não estão completamente diferenciadas. O que indicaria que o seu isolamento não ocorreu a um tempo muito remoto. Ou ainda que apesar de significativamente diferentes, essas populações não estariam completamente isoladas, ocorrendo migrações ocasionais entre as mesmas, o que seria o mais provável diante das características da planície.

A distância D encontrada entre as populações corroboram com os valores de F_{ST} indicando o isolamento das populações. Esses valores foram de forma geral superiores aos encontradas por Sekine (2000), e similares aos encontradas por Bialawski e Pumo (1997). Entretanto o fato de ambos terem trabalhado com espécies de peixes migradoras impede que se faça comparações mais precisas desses dados.

Os valores de F_{ST} dão informações genéticas de distância baseadas em diferenças acumuladas por deriva genética, o que pode indicar eventos recentes. Entretanto a distância D é uma informação da quantidade de mutações, cujos valores indicam o acúmulo dessas mutações ao longo do tempo. Considerando-se que a última grande cheia registrada na régua hidrométrica de Porto São José foi a de 1982/83 (ITAIPU BINACIONAL), ou seja a

quase vinte anos atrás, torna-se difícil afirmar se essas mutações ocorreram antes ou depois dessa cheia. O que se pode indicar com os dados obtidos é não ocorreu completa homogeneização das populações dessas lagoas no período posterior a essa cheia.

Apesar dos valores de F_{ST} , Nm e da distância D indicarem o isolamento das populações, os valores de diversidade demonstram que elas mantêm sua variabilidade genética. O que é de grande relevância na garantia da manutenção dessas populações.

Os resultados obtidos pelas análises genéticas indicam que as populações de *Gymnotus carapo* estudadas muito provavelmente devem continuar nas lagoas mesmo durante as cheias. Outra possibilidade é a de que permaneçam nas várzeas ou matas que circundam as lagoas, e retornem para a lagoa durante a vazante. Não havendo dessa forma a dispersão e conseqüente homogeneização dessas populações.

Seria importante a comparação de populações de fora da bacia do Paraná com as populações estudadas. A comparação entre essas populações poderia informar o quanto é significativa a diferença das populações da planície em relação à populações de fora da bacia.

O fato de não haver nenhum ponto de coleta abaixo da foz do rio Ivinheima impede a conclusão sobre a possibilidade de alguns espécimens irem para a calha dos rios durante a vazante e não retornarem às lagoas, o que pode ser indicado pela sua presença nos rios Ivinheima e Baía mesmo raramente também na calha principal do rio Paraná (Agostinho & Júlio Jr, 1999). Além

disso os espécimens foram coletados em bancos de macrófitas flutuantes, o que permite levantar também a possibilidade de que com o deslocamentos desses bancos ocorra a dispersão de alguns indivíduos. Como também esses bancos de macrófitas seguem o fluxo do rio seria necessário a análise de populações que estivessem abaixo da foz do Ivinheima.

Assim pode-se concluir que o pulso de inundação na planície de inundação do alto rio Paraná não promove a completa homogeneização das populações de *G. carapo* cf. Além disso levanta-se necessidade de se conhecer melhor o comportamento dessa espécie.

IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS DENTRO DE *Hoplias malabaricus*

A família Erythrinidae é composta pelos gêneros *Hoplias*, *Hoplertryrinus* e *Erythrinus*. Pertencem ao gênero *Hoplias* os peixes conhecidos como traíras. 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 *larcedae*. Cada um destes grupos poderia ser composto por espécies ainda não definidas (Oyakawa, 1990, citado por Morelli, 1998). Assim, o enquadramento de muitas populações de traíras como a espécie *H. malabaricus* pode não ser taxonomicamente consistente, como apontam análises citogenéticas (Bertollo, *et al.*, 1997a).

Dentro deste 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 revela a possibilidade de isolamento reprodutivo entre algumas populações conhecidas. A diferenciação tem sido encontrada em diversos níveis como o número de cromossomos variando de 39 a 42; as diferenças nas formas dos cromossomos indicando ocorrência de rearranjos cromossômicos e até a determinação do sexo são complexos e não são homogêneos, com cromossomos sexuais múltiplos (Bertollo, *et al.*, 1997b).

Apesar de morfologicamente todas essas populações serem consideradas como *H. malabaricus*, com base nas informações citogenéticas foi possível caracterizar pelo menos 5 grupos com citótipos diferenciais. Essas constatações talvez forcem, em futuro próximo, a uma revisão taxonômica do gênero *Hoplias* (Bertollo, *et al.*, 1979, 1997a,b; Dorgan *et al.*, 1998; Dergan e Bertollo, 1990).

O aparecimento desses citótipos em *H. malabaricus* poderia resultar, inicialmente, do sedentarismo da espécie e da baixa migração, o que induz a formação de populações locais e subpopulações com pouca conexão por fluxo gênico, como decorrência do isolamento-por-distância. Portanto, os citótipos podem ser interpretados como reflexos cromossômicos de adaptações bem sucedidas.

Atualmente, os grupos detectados não estão isolados geograficamente, podendo ocorrer simpatria de citótipos (H.F. Júlio Jr., comunicação pessoal). As traíras da espécie em questão são abundantes em ambientes lênticos na planície de inundação do alto rio Paraná (Agostinho *et al.*, 1997), mas não existe informações seguras sobre o(s) citótipo(s) que compõem as populações dessa região.

O emprego de metodologias de biologia molecular poderia contribuir para detecção de

marcadores moleculares associados a citótipos dentro do grupo *malabaricus*. Os marcadores poderiam ser utilizados para a identificação de citótipos mesmo em espécimes que não mais apresentam condições de preparação citogenéticas, tais como indivíduos mortos preservados em formol ou álcool. Além disso, os marcadores poderiam oferecer evidências de populações de *Hoplias* geneticamente isolados, apesar da simpatria.

Entre as metodologias de análise molecular, têm sido crescentemente empregadas aquelas baseadas em fragmentos de DNA amplificados com a técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Durante até 40 ciclos sucessivos, cada um com três etapas de alterações de temperatura, ocorre a amplificação de segmentos de DNA. Em cada ciclo o DNA é, inicialmente, desnaturado em temperatura em torno de 94 °C. Com o abaixamento da temperatura para 37-55 °C, ocorre o anelamento dos *primers* em uma ou mais localidades do genoma, de acordo com o grau de homologia. A elevação da temperatura para 72 °C permite a atuação da *Taq*-polimerase e a síntese de polinucleotídeo complementar a uma das fitas da região intermediária entre dois *primers*. Após a etapa de polimerização, o ciclo seguinte é iniciado e novamente todo o DNA do tubo é aquecido e desnaturado, inclusive as moléculas recém sintetizadas. A amplificação é exponencial e dura cerca de 5 horas. Note-se que a *Taq*-polimerase é estável por bastante tempo à temperatura de 94 °C. Uma vez que os dois *primers* estão localizados em fitas opostas e distantes até 4,5, acontecerá a amplificação da dupla hélice da região intermediária.

A técnica desenvolvida por Williams *et al.*, 1990), que ficou conhecida como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), amplifica material genômico com *primers* curtos (10-11 bases) de seqüências nucleotídicas arbitrárias, que amplificam seqüências desconhecidas de DNA. Em cada amplificação um único *primer* utilizado. Como o *primer* é curto, é provável que ocorram regiões de

homologia no genoma. Além disso, algumas das regiões de homologia estarão próximas (até 4,5 kb) no genoma e invertidas. Nesta situação o segmento intermediário será amplificado e poderá ser detectado por eletroforese em gel. Portanto, um *primer* poderá se anelar em diversas posições e vários segmentos diferentes poderão ser 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 sequência repetitiva de um microssatélite ou SSR (*Single Sequence Repeats*).

São reconhecidas três classes de DNA repetitivo, que são definidas pelo comprimento das unidades repetitivas. No DNA satélite a unidade de repetição é uma sequência com centenas ou até milhares de nucleotídeos. O DNA minissatélite é constituído por blocos de sequências repetitivas com 10 a 64 bases (Jeffreys *et al.*, 1985), que são também denominados VNTR DNA (*Variable Number of Tandem DNA*). As unidades repetitivas mais simples, com sequência de até 6 bases, são denominadas SSR (*Single Sequence Repeats*) ou microssatélites (Litt e Luty, 1989; Tantz, 1989).

Os segmentos formados por blocos de microssatélites são relativamente pequenos, com menos de 200 pb na dupla hélice (Raisnam *et al.*, 1992). Uma característica dos microssatélites é a sua distribuição casual ao longo do cromossomo, com exceção das regiões teloméricas e centroméricas, onde são raras (Heame *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 1990).

Portanto, há grande semelhança entre as técnicas SPAR e RAPD que, como mencionado anteriormente, também é baseada em *primer* único. A mais importante diferença entre as duas metodologias reside nas sequências alvo dos *primers*. Enquanto o RAPD utiliza *primer* que foi desenhado sem visar, *a priori*, a amplificação de determinados segmentos do genoma, a

técnica SPAR amplifica a região que intercala dois blocos de microssatélites. Conseqüentemente, o resultado do SPAR pode ser interpretado como um mapeamento de microssatélites no genoma do organismos estudado.

Não há limitações ou dificuldades do tipo que são encontradas para a amplificação de locos SSR. Para aplicação da técnica SPAR não há necessidade de construção da biblioteca genômica total ou parcial do organismo de interesse e o seqüenciamento de muitos segmentos para posterior seleção. Os *primers* têm alcance amplo e são imediatamente aplicáveis, em princípio, a qualquer organismo. Os *primers* SPAR com sequência tetranucleotídica têm se mostrado eficientes na produção de padrões polimórficos informativos intraespecíficos (Gupta *et al.*, 1994) e interespecífico (Fernandes-Matioli, 1999; Albert *et al.*, 1999).

Esse estudo visou avaliar o polimorfismo molecular, revelado pela técnica SPAR, e relacionar marcadores moleculares SPAR com os citótipos que ocorrem em populações de *Hoplias malabaricus* na planície de inundação do alto rio Paraná.

MATERIAISE MÉTODOS

A espécie *Hoplias malabaricus*, que incluem os peixes conhecidos como traíra, utilizados neste trabalho são tipicamente de água doce, atingem cerca de 60 cm comprimento e pesam em torno de 3 kg. As traíras são facilmente reconhecidas pelos grandes pelos grandes caninos da porção anterior muscular e pela nadadeira dorsal angular. Possuem um caráter sedentário e com baixa intensidade de migração, com uma distribuição geográfica ampla abrangendo a América do sul e Central (Morelli, 1998).

Foram coletados, até o momento, 25 indivíduos da planície de inundação do alto rio Paraná, na região de Porto Rico. Os mesmos foram mantidos vivos e transportados para o

Departamento de Biologia Celular e Genética, onde foram processados visando dois estudos com abordagens diferentes.

Os procedimentos para a aplicação das técnicas (RAPD e SPAR) foram conduzidas no Laboratório de Genética Geral do DBC-UEM e no Laboratório de Genética do Nupelia – UEM. Ao mesmo tempo, a equipe do Prof. H.F. Júlio Jr., no laboratório de Citogenética de Peixes, realizar estudos citogenéticos para a determinação da configuração cariotípica de todos os indivíduos.

De cada indivíduo utilizaram-se tecido do músculo e/ou da nadadeira, que inicialmente foram conservados em tubos eppendorfs de 1,5 ml com etanol absoluto. Para a extração do DNA total, a metodologia usada foi adaptada da técnica utilizada por Whitmore *et al.* (1992). Os fragmentos de tecido muscular ou nadadeira foram macerados com nitrogênio líquido em *graal* de porcelana, logo em seguida, a eles foram adicionados tampões como TH e PS e colocados no banho-Maria com proteinase K (2,5 mg/ml) a 42 °C, por cerca de 1 hora. Em seguida, cada amostra teve seu DNA lavado com fenol/tris pH 8,0 e clorofórmio (puro) duas vezes e depois somente com clorofórmio. O DNA obtido foi precipitado com NaCl (5M) e com etanol 100%, e ressuspenso com tampão T.E. 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%.

De acordo com Maniglia *et al.* (2000), padrões de RAPD possibilitam a discriminação dos indivíduos do gênero *Hoplias* da planície de inundação do alto rio Paraná em três grupos distintos. Os indivíduos estudados neste trabalho foram analisados com a técnica RAPD para reconhecimento dos grupos conforme Maniglia *et al.* (2000). As condições de amplificação do DNA foram baseadas na metodologia utilizada por Bardack e Skibinski (1994). Alguns *primers* foram utilizados, porém dois deles, puderam

agrupar os indivíduos em grupos correspondentes ao citótipo até então identificados. Esses *primers* foram OPW-09 e OPW-19, do Kit OPW da Operon Technologies (Alameda, CA, USA). Após a seleção, as amostras de agarose 1,4% e coradas com brometo de etídio para registro fotográfico e comparação.

Para a aplicação da técnica SPAR foram feitos testes com *primers* de sequências repetitivas tetranucleotídicas. A seleção dos mesmos realizou-se com os 13 indivíduos, anteriormente utilizados para a técnica RAPD. Dentre os sete *primers* testados, dois deles alcançaram resultados claros e concretos para o agrupamento dos indivíduos nos mesmos grupos correspondentes aos encontrados em RAPD e, consequentemente redistribuí-los aos citótipos identificados. Os *primers* selecionados foram *micro 11* (GGAC-4) denominado por Fernandes-Matioli (1998) e GGAC(3)T.

Em seguida, as amostras também passaram por eletroforese em gel de agarose 1,4% e coradas com brometo de etídio para registro fotográfico e análise comparativa dos dados obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 7 (7-A e 7-B) e 8 (8-A e 8-B) ilustram a eletroforese em gel dos produtos de amplificação por RAPD (7A e 7B) e por SPAR (8A e 8B), em *Hoplias malabaricus* com os *primers* OPW-09, OPW-19, GGAC(4) e GGAC(3)T respectivamente. Em todas as Figuras, a primeira pista corresponde ao padrão de peso molecular Ladder 100 bp (Gibco BRL) e a segunda pista representa o controle negativo ou branco (mistura de reação sem DNA). Em sequência, nas demais pistas tanto da Figura 7 (7-A e 7-B) quanto da Figura 8 (8-A e 8-B) estão posicionados os três grupos de indivíduos que foram determinados pelos padrões eletroforéticos característicos de cada grupo. Estes identificados molecularmente foram denominados de acordo com a semelhança

encontrada nos citótipos já descritos para *H. malabaricus* por Bertollo et al. (2000).

Os indivíduos do grupo A com citótipo de 42 cromossomos macho/fêmea, os do grupo C com citótipo de 40 cromossomos macho/fêmea e os do grupo D com citótipo de 39/40 cromossomos macho/fêmea. Nas Figuras 7A e 7B as pistas 3, 4, 5, 14 e 16 revelam o padrão eletroforético do grupo C; as pistas 6, 7 e 8 revelam o padrão

eletroforético do grupo A; enquanto o padrão eletroforético do grupo D pode ser visto nas pistas 10, 11, 17 e 18.

Já nas Figuras, 8A e 8B, representam os padrões eletroforéticos SPAR encontrados para os grupos A, C e D. Estes mesmos são demonstrados nas pistas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 para o grupo C; as pistas 9, 10 e 11 para o grupo A; e por fim as pistas 12, 13, 14 e 15 para o grupo D.

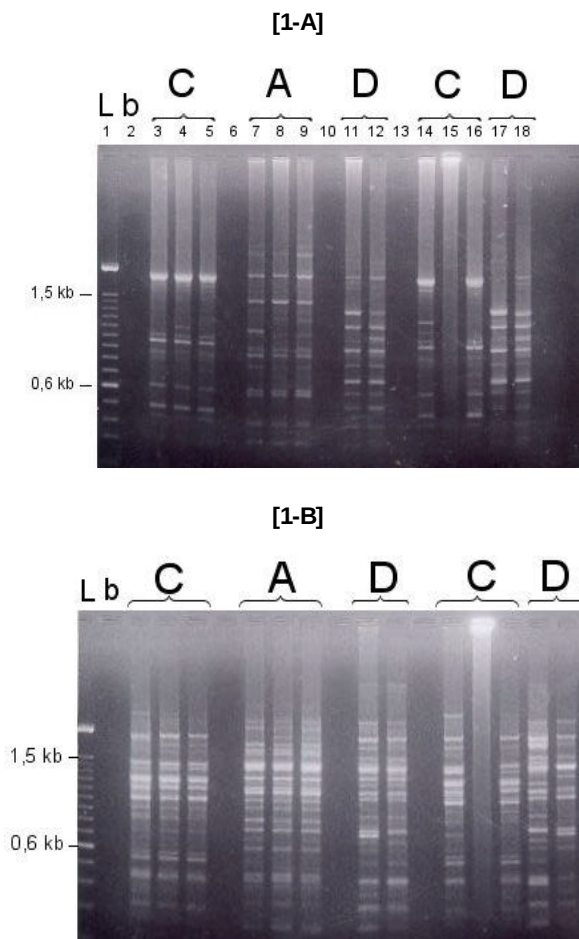


Figura 7. Gel de agarose com marcadores moleculares RAPD amplificados com os *primers* OPW-09 [1-A] e OPW-19 [1-B], evidenciando a ocorrência de 3 grupos distintos dentro da espécie *Hoplias malabaricus*, identificados pelos padrões de bandas. Pista 1: Ladder 100 bp; pista 2: controle negativo; pistas 3, 4, 5, 14 e 16: grupo C; pistas 7, 8 e 9: grupo A ; pistas 11, 12, 17 e 18: grupo D.

Em ambas as Figuras, 7 e 8, os citótipos puderam ser caracterizados e os dados moleculares obtidos para *H. malabaricus* do rio Paraná refletem, segundo Vazzoler, a influência da alteração ambiental sobre suas populações anteriormente isoladas. Com o deslocamento da barreira que separava as províncias, do Paraná Superior e a Parano-platense, para a construção da “Itaipu”, foi possível a migração do citótipo C, que passou a integrar a fauna local e a coexistir simpatricamente com os outros citótipos. Apesar de ser fato a relação simpátrica

entre os grupos nenhum híbrido foi encontrado neste local, evidenciando o isolamento reprodutivo de *Hoplias malabaricus*.

Além do que foram identificados marcadores moleculares SPAR para os três citótipos caracterizando-os diferentemente através dos primers *micro 11* e GGAC(3)T, como visto na Figura 9. Esses marcadores, exclusivo para *H. malabaricus*, encontrados foram fontes essenciais para reafirmar a complexidade de espécies formando o grupo *malabaricus*.

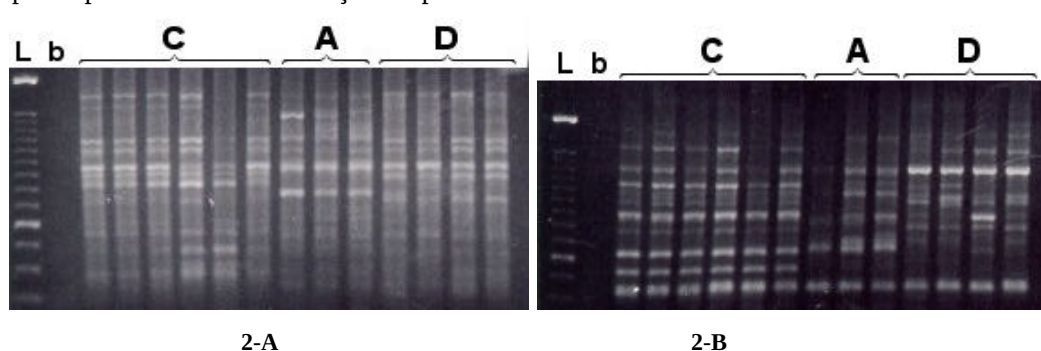


Figura 8. Produtos da amplificação SPAR com os primers *micro 11* (2-A) e GGAC(3)T (2-B) identificando os três citótipos e seus respectivos marcadores na espécie estudada. Em ambas as Figuras, a pista 1 corresponde ao Ladder 100pb(L); a pista 2 corresponde ao controle negativo (b); as pistas de 2 à 8 correspondem ao citótipo C; as pistas de 9 à 11 correspondem ao citótipo A e as pistas de 12 à 15 ao citótipo D.

CONCLUSÕES

Conjunto de dados moleculares obtidos com as técnicas RAPD e SPAR são consistentes em mostrar a ocorrência de três grupos distintos dentro de *Hoplias malabaricus* na planície de inundação do alto rio Paraná.

Estes grupos estão associados a citótipos encontrados, sendo eles correspondentes ao citótipo 42 (A), um correspondente ao citótipo 40 (C) e ao citótipo 39/40 macho/fêmea (D).

Com os os primers *micro 11* e 3T foram identificados marcadores moleculares SPAR exclusivos para cada um dos três grupos.

Os marcadores SPAR encontrados evidenciam características distintas importantes e claras, que indicam uma complexidade de

espécies formando o grupo *malabaricus* até agora tido como único.

Os dados moleculares obtidos para *H. malabaricus* do rio Paraná refletem a influência de alteração ambiental que justifica o aparecimento do citótipo C que passou a integrar a fauna local e a coexistir simpatricamente com os outros citótipos.

Apesar da relação simpátrica entre os grupos nenhum híbrido foi encontrado neste local, evidenciando o isolamento reprodutivo de *Hoplias malabaricus*. Logo, a possibilidade de discriminação de grupos simpátricos via RAPD e SPAR confirmam a complexidade e necessidade de revisão taxonômica de *H. malabaricus*.

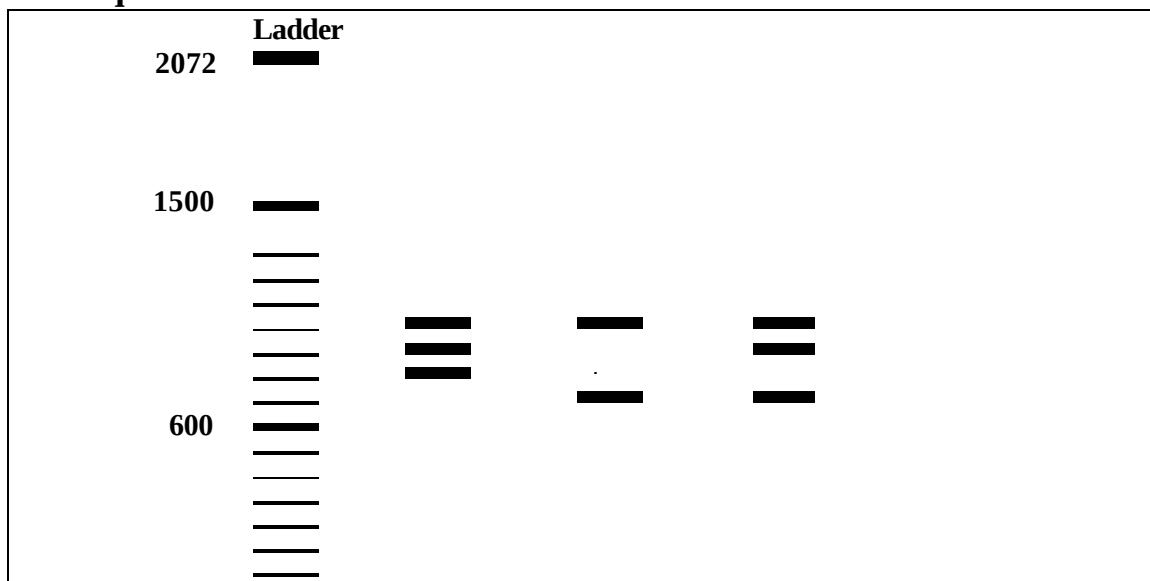
Esquema-1**Esquema-2**

Figura 9: Esquema representativo dos padrões de marcadores moleculares SPAR obtidos com os *primers* *micro 11* (Esq. 1) e GGAC(3)T (Esq. 2) na espécie analisada, correspondente aos 3 citótipos C, A e D que foram caracterizado nos indivíduos estudados respectivamente.

**VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE
POPULAÇÕES DE *Hoplias
malabaricus* DAS BACIAS DOS RIOS
PARANÁ, PARAGUAI E ARAGUAIA**

As traíras, peixes pertencentes ao gênero *Hoplias*, são carnívoros e apresentam comportamento sedentário. Os representantes deste gênero estão amplamente distribuídos na América do Sul e América Central.

Entre os especialistas não há consenso quanto à taxonomia dentro de *Hoplias*, 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). Assim, o que se considera como espécie *Hoplias malabaricus* constituir-se-ia em um complexo de espécies, com pelo menos cinco citótipos diferentes.

As divergências ao nível cromossômico são, às vezes, de tal magnitude que revelam, inclusive, a possibilidade de isolamento reprodutivo entre algumas populações conhecidas. Essas constatações talvez forcem, futuramente, uma revisão taxonômica do gênero *Hoplias* (Bertollo *et al.*, 1979, 1997a,b; Dergan *et al.*, 1998; Dergan e Bertollo, 1990).

A emergência desses citótipos poderia resultar, pelo menos parcialmente, do hábito sedentário da espécie. Essa característica talvez induza a formação de populações locais ou subpopulações com pouca conexão por fluxo gênico, como decorrência de isolamento-por-distância. Portanto, seria de se esperar que populações de diferentes bacias hidrográficas divergissem geneticamente. Para verificar esta divergência podem ser utilizadas técnicas moleculares que detectam variações genômicas.

Algumas técnicas moleculares não exigem conhecimento prévio de seqüências nucleotídicas do organismo estudado. Entre as metodologias com estas características estão

disponíveis o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e o SPAR (*Single Primers Amplifications Reactions*), ambas baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

O RAPD-PCR, baseia-se na amplificação de segmentos de DNA genômico com *primers* curtos (10-11 bases) de seqüências nucleotídicas arbitrárias, que amplificam seqüências desconhecidas do DNA. Usualmente, apenas um *primer* é utilizado, o qual anela-se às fitas opostas de DNA em distâncias de até 4,5 pb, permitindo a amplificação dos sítios de anelamento e da região intermediária.

Na técnica SPAR, o *primer* é construído com três ou quatro unidades repetitivas de um tipo de microssatélite, com isso, o segmento genômico a ser amplificado, será aquele que se encontra entre dois blocos de microssatélite. O resultado das amplificações pode ser interpretado como um mapeamento de blocos de microssatélites. Em função da grande homogeneidade na distância entre dois blocos de microssatélites, os marcadores gerados por SPAR são efetivos para discriminação de linhagens e espécies, pois geralmente as variações encontradas, são restritas a uma população.

O objetivo proposto para este trabalho foi analisar o polimorfismo molecular via RAPD-PCR e SPAR de populações de *H. malabaricus* dos rios Formoso, Araguaia e Jacuba, localizados no Parque das Emas (GO) e rio Manso (MT), relacionando-as com populações do alto rio Paraná (PR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados 39 indivíduos dos rios Formoso, Araguaia, Jacuba e Manso e utilizou-se, também, indivíduos coletados anteriormente na planície de inundação do alto rio Paraná.

Os indivíduos foram armazenados em etanol e mantidos em freezer -20 °C. Foram retiradas amostras de tecido muscular para a extração do DNA, que se baseou na metodologia fenol/clorofórmio. Em seguida, realizou-se a quantificação do DNA por comparação com o

DNA do fago λ .

Para a quantificação e análise da variabilidade genética, foram realizadas duas reações de RAPD-PCR, utilizando os *primers* OPW-19 e OPX-04, e duas reações de SPAR, utilizando-se os *primers* micro 11 e (GGAC)₃T. As condições de amplificação do DNA foram as apresentadas por Bardakci e Skibinski (1994).

Os segmentos de DNA amplificados de cada amostra foram fracionados em gel de agarose 1,4%, coradas com brometo de etídio, em campo elétrico de 70 V. As bandas produzidas por cada amostra foram fotografadas no transluminador e todos os indivíduos foram comparados entre si pelos padrões de bandas produzidas.

RESULTADOSE DISCUSSÃO

Quanto aos padrões moleculares, foi possível detectar três grupos de indivíduos no alto rio Paraná, enquanto que nos outros rios todos os indivíduos apresentaram perfis eletroforéticos semelhantes (Fig.10 e 11).

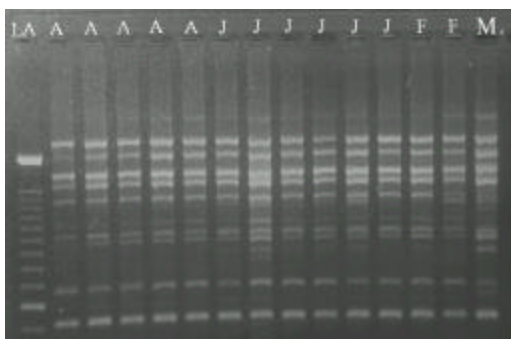


Fig.10. Marcadores RAPD dos indivíduos dos rios Araguaia (A) e Jacuba (J), com o *primer* OPX-04.

Os indivíduos dos rios Formoso, Araguaia, Jacuba e Manso apresentaram o mesmo padrão de bandas de um dos três grupos presentes no alto rio Paraná. A semelhança dos padrões de bandas seria um indicativo de que as populações de *Hoplias malabaricus* dos rios Formoso, Araguaia, Jacuba e Manso teriam origem geográfica comum.

Como alguns desses rios não se comunicam, a semelhança de padrões possivelmente seria resultante de interferência humana. De fato, sabe-se que nos rios encontrados no Parque das Emas (Araguaia, Formoso e Jacuba) houve a introdução de espécimes de traíra e que esses são iguais a um dos três grupos de traíras que habitam o alto rio Paraná.

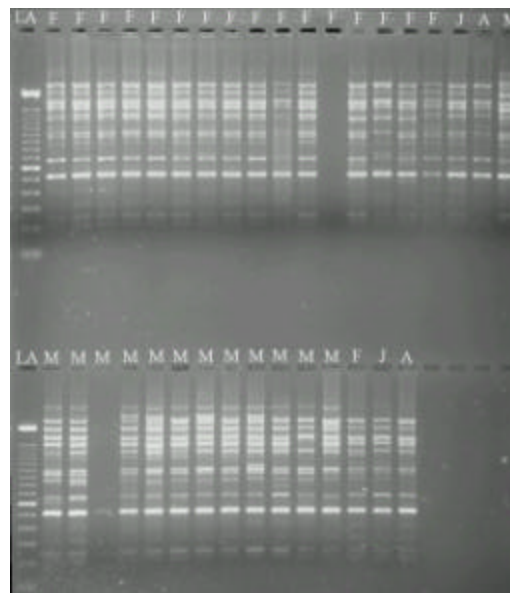


Figura 11. Marcadores de RAPD dos indivíduos dos rios Formoso (F) e Manso (M), com o *primer* OPX-04.

GENÉTICA DE POPULAÇÕES VEGETAIS

DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Eugenia* spp. (MYRTACEAE)

Na região noroeste do Estado do Paraná e sudeste do Mato Grosso do Sul encontra-se um importante trecho do rio Paraná, onde diversos estudos vem sendo desenvolvidos como levantamento de flora, dinâmica na restauração natural das florestas, fitossociologia dos

remanescentes florestais e outros.

Na planície de inundação do alto rio Paraná, Myrtaceae é uma das famílias com maior riqueza específica. Esta família possui aproximadamente 100 gêneros e 3500 espécies, de distribuição quase que exclusivamente tropical. São plantas lenhosas arbustivas ou arbóreas, caracterizadas pelos numerosos canais oleíferos presentes na forma de pequenos pontos translúcidos, que aparecerem nas folhas, frutos e sementes. Dentro da família Myrtaceae o gênero *Eugenia* é o que apresenta maior número de espécies na planície de inundação do alto rio Paraná. Alguns representantes deste gênero, no entanto possuem características taxonômicas, vegetativas e reprodutivas semelhantes, dificultando a identificação botânica dos mesmos.

As informações disponíveis até o momento demonstram que *Eugenia moraviana* assemelha-se a *Eugenia florida*. No material examinado *E. moraviana* se diferencia por apresentar folhas menores, nervura central com pêlos ferrugíneos esparsamente distribuídos abaxialmente. Entretanto esses caracteres não são suficientes para separar as espécies, pois os mesmos sofrem variações de acordo com o ambiente em que se encontram, não havendo então um consenso se estas duas populações representam espécies distintas ou sinônimas.

Freqüentemente, algumas técnicas de biologia molecular podem ser empregadas com sucesso para a identificação de linhagens ou espécies próximas, principalmente quando a semelhança morfológica dificulta o reconhecimento pelas características morfológicas. Portanto, esta abordagem poderia ser empregada como auxiliar na discriminação de *E. florida* e *E. moraviana*, bem como na identificação dos espécimes morfológicamente intermediários.

Como estas espécies não são ainda conhecidas ao nível genômico, só podem ser utilizadas técnicas que amostram o genoma sem necessidade de informações prévias sobre seqüências ou organização do material genético. Sob essas condições, as metodologias mais

acessíveis e menos dispendiosas que estão disponíveis são o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e o SPAR (*Single Primers Amplifications Reactions*), ambas baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

O RAPD baseia-se na amplificação de DNA genômico com *primers* curtos de seqüência aleatória. Usualmente, apenas um *primer* é utilizado, o qual anela-se às fitas opostas de DNA em distâncias de até 4,5 pb, permitindo a amplificação dos sítios de anelamento e da região intermediária. Esta técnica permite investigar variações no genoma baseando-se no número e tamanho dos fragmentos amplificados.

A técnica SPAR é semelhante ao RAPD, uma vez que, usualmente, apenas um *primer* é utilizado para as amplificações. A diferença essencial é a existência de um critério para definir a seqüência de bases do *primer* que será utilizado. O *primer* é construído com três ou quatro unidades repetitivas de um tipo de microsatélite. Neste caso, os segmentos amplificados por PCR serão aqueles localizados entre dois blocos de microsatélites com a mesma unidade repetitiva do *primer*. O resultado das amplificações pode ser interpretado como um mapeamento de blocos de microsatélites no genoma do organismo estudado. Em função da grande homogeneidade na distância entre dois blocos de microsatélites, os marcadores gerados por SPAR são efetivos para discriminação de linhagens e espécies, pois geralmente as variações encontradas são restritas a uma população ou grupo.

O estudo do gênero *Eugenia* representa uma contribuição importante para o conhecimento da flora da planície de inundação do alto rio Paraná. O conhecimento da diferenciação genética de populações deste gênero contribuirá na obtenção de informações acerca da distribuição dessas espécies nos diferentes ambientes dessa área, revelando seu habitat preferencial, além de fornecer subsídios ecológicos e informações para revegetação.

O objetivo desse estudo foi se duas

populações do gênero *Eugenia* (Myrtaceae) em área riparia na planície de inundação do alto rio Paraná, em Porto Rico (PR), estão geneticamente isoladas e se há fluxo gênico entre elas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados folhas jovens de 56 espécimes, identificados com *Eugenia moraviana* (11), *Eugenia florida* (13), *Eugenia hyamales* (16) e 13 indivíduos com características morfológicas intermediárias entre *E. moraviana* e *E. florida*, para a extração de DNA total. Após a coleta, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas no laboratório em freezer -70°C , permanecendo congeladas até o processamento. A extração de DNA foi efetuada com metodologia baseada em fenol/clorofórmio. Para a extração de DNA genômico de *Eugenia spp.*, utilizou-se o protocolo em anexo.

Após o término da extração, realizou-se a quantificação de DNA em cada amostra para avaliar a concentração de DNA presente. Para isso utilizou-se três quantidades (20, 50 e 100 ng) de DNA do fago λ . Com isso, foi possível comparar o fragmento de DNA das amostras com o fragmento do fago λ e inferir a concentração de DNA presente em cada amostra. Em seguida, realizou-se os testes com os *primers* dos kits OPA, OPX e OPW e os microssatélites (AAGC)₄, (GGAC)₃T, (GGAC)₃C, para a seleção dos oligonucleotídeos e marcadores moleculares que foram utilizados neste trabalho. Para as amplificações, foram utilizados os *primers* OPA-19, OPA-13, OPX-03, OPX-06, OPW-03 e OPW-17 e os *primers* tetranucleotídeos (AAGC)₄, (GGAC)₃T e (GGAC)₃C. O DNA amplificado foi fracionado em gel de agarose 1,4%, preparado com brometo de etídio, em campo elétrico 5 V.cm^{-1} . Os géis foram fotografados sob luz UV.

O protocolo utilizado para a extração do DNA genômico consistiu nos seguintes passos:

1. Pesar aproximadamente 0,2 g de tecido (folhas

verdes) e congelar rapidamente em Nitrogênio líquido. Macerar até obter um pó fino. É imperativo não deixar a amostra descongelar até que o tampão não seja adicionado.

2. Transferir a amostra macerada para um microtubo. Adicione 1.000 μl de Tampão de Extração. Agitar por inversão e batendo no tubo.
3. Incubar a 65°C durante 30 minutos. Durante a incubação, agite os tubos a cada 5-10 minutos para homogeneizar a suspensão. Retirar os tubos e resfriá-los à temperatura ambiente.
4. Adicionar 600 μl de SEVAG. Agitar durante 5 min, invertendo os tubos pelo menos 20 vezes.
5. Centrifugar durante 5-8 min à aproximadamente 12000 rpm.
6. Transferir o sobrenadante (aproximadamente 450 μl) de cada tubo, combinando-os em um único microtubo limpo. Descartar o pellet.
7. Adicionar 600 μl de isopropanol gelado. Agitar lentamente por inversão.
8. Centrifugar por 10 minutos à 12000 rpm. Se o pellet não estiver visível coloque o tubo a -20°C por 20-30 min. E centrifugar novamente.
9. Descartar o sobrenadante sem perder o pellet. Esperar o pellet secar à temperatura ambiente, até que nenhum traço de isopropanol permaneça.
10. Ressuspender o pellet em 130 μl de TE [1x] com RNase na concentração final 10 $\mu\text{g/ml}$. Deixar 1 hora a 37°C ou à temperatura ambiente.
11. Adicionar 65 μl de fenol e 65 μl de clorofórmio. Agitar a mistura suavemente por inversão e batendo no tubo durante 2-3 min.
12. Centrifugar 5 min. a 12.000 rpm.
13. Transferir 100 μl do sobrenadante para um microtubo.
14. Adicionar 150 μl de TE sem RNase.
15. Adicionar 250 μl de SEVAG. Agitar suavemente por inversão durante 2-3 min. Centrifugar 5 min a 12.000 rpm.
16. Transferir 200 μl do sobrenadante para outro microtubo.
17. Adicionar 21 μl de acetato de amônio 4 M, misturar gentilmente.
18. Adicionar 120 μl de isopropanol gelado. Misture bem, delicadamente por inversão.
19. Incubar a -20°C durante a noite.

20. Centrifugar, na centrífuga refrigerada, a 12.000 rpm durante 15 minutos (programa 50).
21. Descartar o sobrenadante e lavar o DNA (*pellet*) com etanol 70% gelado seguido por etanol 95% gelado.
22. Secar ao ar livre e ressuspender o *pellet* em 50 μ l de TE [1/10], sem RNase.
23. Guardar o DNA a -20°C , até posterior utilização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

Com relação aos indivíduos com características morfológicas intermediárias, constatou-se que três produziram um perfil eletroforético diferenciado, como visto na Figura 12, o que sugere tratar-se de uma espécie ainda não identificada.

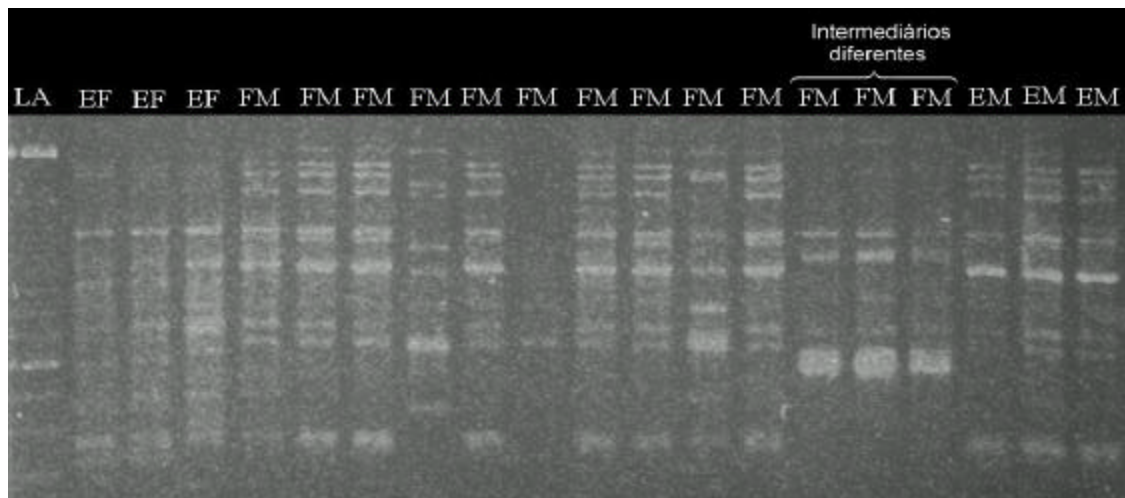


Figura 12. Fragmentos amplificados com o *primer* OPA-19.

Entretanto, os demais espécimes estudados, produziram padrões de bandas diferenciados de acordo com o *primer* utilizado, promovendo. Por exemplo, com o *primer* OPX-06 e OPW-04 verificou-se que *E. moraviana*, *E. florida* e os demais intermediários apresentaram o mesmo perfil eletroforético (Figura 13), o que sugere tratar-se de espécies sinônimas, ou seja, a mesma espécie.

Com os demais *primers* testados observou-se que *E. florida* e *E. moraviana* apresentaram padrões de bandas diferenciados. Dos indivíduos com características intermediárias, 10 apresentaram o mesmo perfil eletroforético de *moraviana* conforme mostrado na Figura 3, sugerindo que *E. florida* e *E. moraviana* não

constituem sinônimas e que os 10 espécimes intermediários e *E. moraviana* são a mesma espécie.

Com as informações sobre a presença e ausência de bandas RAPD foram estimados alguns parâmetros genéticos para *E. florida*, *E. moraviana* e a população com características intermediárias.

As estimativas da distância não tendenciosa de Nei encontram-se na Tabela 6. Conforme Thorpe e Solé Cava (1994), com dados obtidos com isoenzimas, valores da distância de Nei acima de 0,16 constituem um forte indicativo de que as espécies não são sinônimas. Por outro lado, também podem ser encontrados valores abaixo de 0,16 para espécies diferentes.

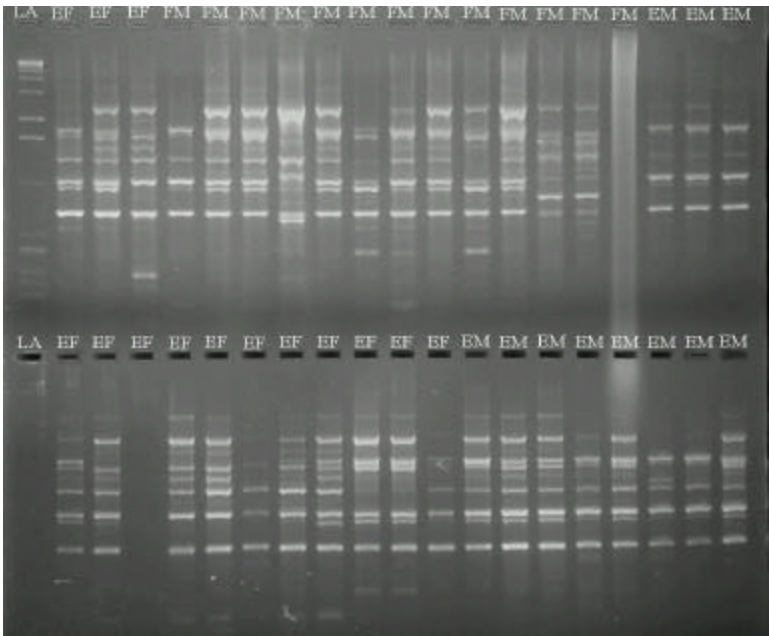


Figura 13. Fragmentos amplificados com o *primer* OPX-06

Estes resultados poderiam sugerir que as três populações são espécies diferentes. No entanto, como mencionado anteriormente, os padrões eletroforéticos não produziram resultados consistentes, isto é, alguns *primers* situavam os intermediários próximos de *E. moraviana* e outros *primers* mostraram que seriam mais semelhantes aos indivíduos de *E. florida*.

Tabela 6: Distância genética não tendenciosa de Nei entre *Eugenia florida* (EF), *Eugenia moraviana* (EM) e um população de espécimes com características morfológica intermediárias (FM).

	EF	EM	FM
EF	0		
EM	0,2592	0	
FM	0,2619	0,1262	0

Portanto, as estimativas geradas pelos dados não podem ser consideradas conclusivas a

respeito de distância e diferenciação genética. Possivelmente, esta questão seria solucionada com um número maior de *primers* ou marcadores moleculares diferentes.

SPAR - Single Primers Amplifications Reactions

Foi possível a identificação de bandas e padrões eletroforéticos espécie-específicos com o *primer* (AAGC)₄ produziu bandas espécie-específicas para *E. moraviana*, *E. florida*, *E. hiemalis*, *E. multipunctata*, como pode ser visto na Figura 4. Os *primers* (GGAC)₃T e (GGAC)₃C, por outro lado, não produziram marcadores específicos diferenciadores das espécies *E. moraviana* e *E. florida* (Figuras 5 e 6).

As espécies *E. multipunctata* e *E. hiemalis* podem ser identificadas e diferenciadas de todas as outras com marcadores moleculares específicos, conforme mostrado nas Figuras 15, 16 e 17.

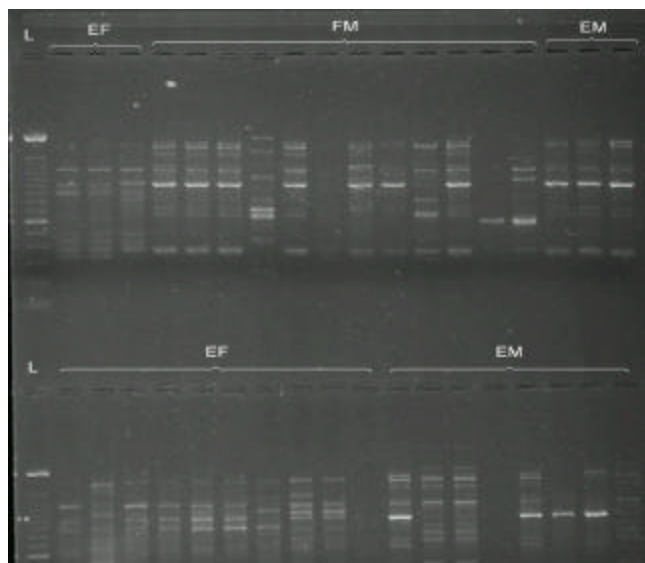


Figura 14. Fragmentos amplificados com o *primer* OPA-19

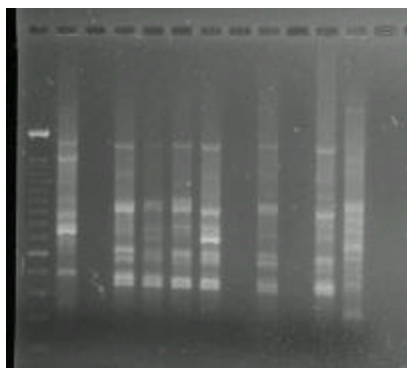


Figura 15. Fragmentos amplificados com o *primer* (AAGC)₄

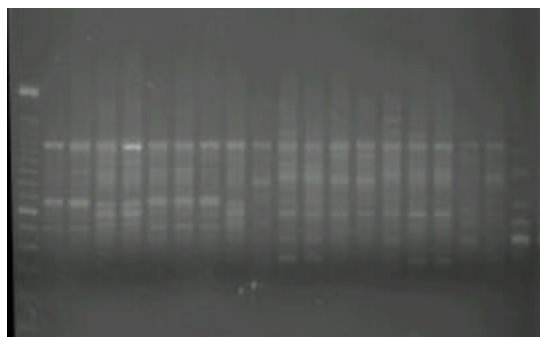


Figura 16. Fragmentos amplificados com o *primer* (GGAC)₃T.

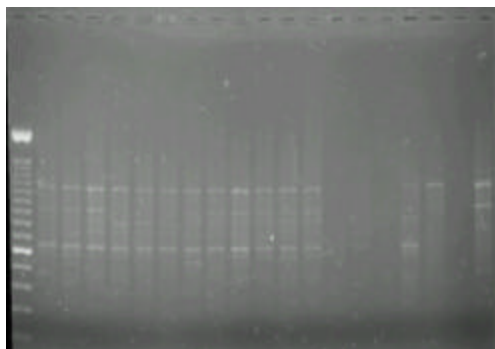


Figura 17: Fragmentos amplificados com o *primer* (GGAC)₃C

CONCLUSÕES

Os dados obtidos com RAPD e SPAR não permitiram a identificação inequívoca das espécies *E. moraviana*, *E. florida* e espécimes intermediários, sugerindo a necessidade de informações adicionais para esclarecer se representam espécies distintas ou sinônimas.

As espécies *E. multipunctata* e *E. hiemalis* estão suficientemente diferenciadas geneticamente para serem discriminadas com marcadores moleculares RAPD e SPAR.

ESTRATÉGIA REPRODUTIVA DE *Lonchocarpus guilleminia* Tul. Malme (FABACEAE) EM FLORESTA RIPÁRIA EM REGENERAÇÃO ENVIDENCIADA POR MARCADORES MOLECULARES

Vários estudos têm demonstrado a importância das áreas ripárias na vida do homem moderno (Souza, 1998; Souza, 1999; Rodrigues, 1991; Mantovani, 1989). Entre eles está o estudo fitossociológico desenvolvido por Souza (1998), que revelou a importância de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme, uma espécie heliófita que ocorre em remanescentes florestais da margem esquerda do rio Paraná, no

município de Porto Rico (PR). Esta espécie é também conhecida como feijão-cru ou imbirá, é arbórea e pode atingir até 24 metros de altura. Em áreas desflorestadas dessa região, ela é a mais abundante no processo de revegetação natural.

Entre as técnicas disponíveis para a análise da variabilidade genética em populações naturais, encontram-se a tecnologia RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990) e SPAR (*single primers amplifications reactions*), entre outras.

A técnica RAPD permite investigar variações no genoma baseando-se no número e tamanho dos fragmentos amplificados. Ela tem sido útil na realização de vários estudos, entre eles: mapeamento genético, diferenciação genética entre populações, filogenia e identificação de clones (Hackett *et al.*, 2000; Bachmann *et al.*, 2000; Obornik *et al.*, 2000; Hollingsworth e Baley, 2000).

Em relação aos microssatélites, assim como os minissatélites, desde o final da década de 80 tem sido revelado que eles apresentam alto grau de polimorfismo, gerado principalmente pela adição ou deleção de unidades repetitivas (Jeffrey *et al.*, 1985; Jeffrey *et al.*, 1988; Tautz, 1989; Weber, 1990; Weber e May, 1989; Taggart e Ferguson, 1991). Por causa de sua natureza polimórfica, os microssatélites são utilizados como marcadores moleculares em

estudos populacionais. A consistência dos padrões de polimorfismo de microssatélites e a possibilidade de identificação de heterozigotos fez com que sejam reconhecidos como marcadores eficientes em avaliações da estrutura genética e fluxo gênico entre populações (Adams *et al.*, 1992; Edwards *et al.*, 1992).

Os estudos com marcadores de microssatélites dependem de *primers* que se anelem à regiões flanqueadoras do bloco de unidades repetitivas. Em alguns casos, os *primers* para amplificação de microssatélites desenvolvidos para determinadas espécies podem ser usados com sucesso em espécies próximas (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

A técnica conhecida como SPAR 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 sequência repetitiva de um microssatélite. Portanto, há grande semelhança entre as técnicas SPAR e RAPD que também é baseada em *primer* único. A mais importante diferença entre as duas metodologias reside nas sequências alvo dos *primers*. Enquanto o RAPD utiliza *primer* que foi desenhado sem visar, a priori, a amplificação de determinados segmentos do genoma, a técnica SPAR amplifica a região que intercala dois blocos de microssatélites. Consequentemente, o resultado do SPAR pode ser interpretado como um mapeamento de microssatélites no genoma do organismo estudado.

Não há limitações ou dificuldades do tipo que são encontradas para a amplificação de locos SSR. Para aplicação da técnica SPAR não há necessidade de construção da biblioteca genômica total ou parcial do organismo de interesse e o sequenciamento de muitos segmentos para posterior seleção. Os *primers* têm alcance amplo e são imediatamente aplicáveis, em princípio, a qualquer organismo. Os *primers* SPAR com sequência tetranucleotídica têm se mostrado eficientes na

produção de padrões polimórficos informativos intraespecíficos (Gupta *et al.*, 1994) e interespecífico (Fernandes-Matioli, 1999; Albert *et al.*, 1999).

A ocorrência de propagação clonal em *L. guilleminianus* foi investigada com o uso das técnicas RAPD e SPAR. O estudo da variabilidade genética desta população em floresta ripária em regeneração, no município de Porto Rico, PR, permite a obtenção de dados baseados em marcadores moleculares e seu cruzamento com informações botânicas. Diante do crescente avanço das áreas de florestas perturbadas, esta seria uma oportunidade para aquisição de conhecimentos que subsidiem a elaboração de modelos de revegetação.

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 ter sido originados de brotamentos.

Materiais e Métodos

Amostragem dos indivíduos

Para a avaliação da variabilidade genética da população de *L. guilleminianus* da floresta regenerada naturalmente, foram amostradas árvores em toda a extensão. Para que essa amostra fosse representativa da variabilidade genética existente, os indivíduos foram incluídos aleatoriamente na amostra.

A amostragem para a investigação sobre a reprodução vegetativa foi realizada deliberadamente dentro de agrupamentos de árvores. Conforme Souza (1998), caso derivem de brotamentos as árvores estariam agrupadas em uma área com raio de 5 a 10 m.

Extração do DNA genômico

Folhas jovens foram coletadas para a extração do DNA total, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -20°C . Aproximadamente 200 mg de folhas congeladas foram utilizadas para a extração do DNA, segundo a metodologia recomendada por Murray e Thompson (1980). Este protocolo, baseado na extração com CTAB, tem se mostrado eficiente na purificação do DNA de vários tipos de plantas (Porebski *et al.*, 1997; Tel-Zur *et al.*, 1999; Bi *et al.*, 1996), e até mesmo no isolamento de DNA primitivo de fósseis (Yang *et al.*, 1997). A quantificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Amplificação via RAPD-PCR

Para a revelação de polimorfismo entre os indivíduos, foram utilizados *primers* dos kits Operon : A, X e W. Foram eles: OPA-02, OPA-04, OPA-07, OPA-17, OPW-03, OPW-11, OPW-13, OPX-01, OPX-03, OPX-04 e OPX-07.

As reações de amplificação foram preparadas contendo dNTPs 0,2 mM, 1,3 μL de tampão 10x, *primer* 0,5 μM , 10 ng de DNA genômico, 1 U de *Taq* DNA polimerase. O volume final de cada reação foi completado para 13 μL com água *milliq*. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador MJ Research Inc. programado para 1 ciclo de 4 min a 92°C ; 40 ciclos de 1 min a 92°C , 1 min e 30 s a 40°C , 2 min a 72°C ; 1 ciclo de 5 min a 72°C , seguido por um período final de 20 min a 20°C .

Controles negativos, sem molde DNA, foram incluídos em cada PCR. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4% com brometo de etídeo,

em campo elétrico de 70 V. O gel foi exposto à luz ultravioleta para visualização dos fragmentos amplificados e registro fotográfico.

Amplificação via SPAR-PCR

Para a amplificação através da técnica SPAR foram selecionados os seguintes *primers*: (GGAC)₄, (GGAC)₃T, (GACA)₄ e (AAGC)₄.

As reações para amplificação foram preparadas em mesmo volume e condições da metodologia utilizada para RAPD. O termociclador foi programado para 5 ciclos de 45 s a 94°C , 1 min a 51°C e 1 min a 72°C ; 30 ciclos de 45 s a 94°C , 1 min a 48°C e 1 min a 72°C .

Controles negativos foram incluídos em cada PCR. Os procedimentos para separação dos fragmentos amplificados e sua visualização foram os mesmos usados para técnica RAPD.

Análise das informações

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 RAPD e SPAR. Para detecção das diferenças presentes, a variável utilizada foi a ausência ou presença das bandas de DNA, quando comparadas as amostras. A ocorrência sistemática de fragmentos diferenciais descartaria a possibilidade de dois indivíduos serem clones.

Resultados e Discussão

Após a amplificação das amostras via RAPD, 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 18-A mostra marcadores moleculares em dois indivíduos do grupo A e dois indivíduos do grupo B, indicando que esses

indivíduos possam ser clones. Observa-se porém, na Figura 18-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.

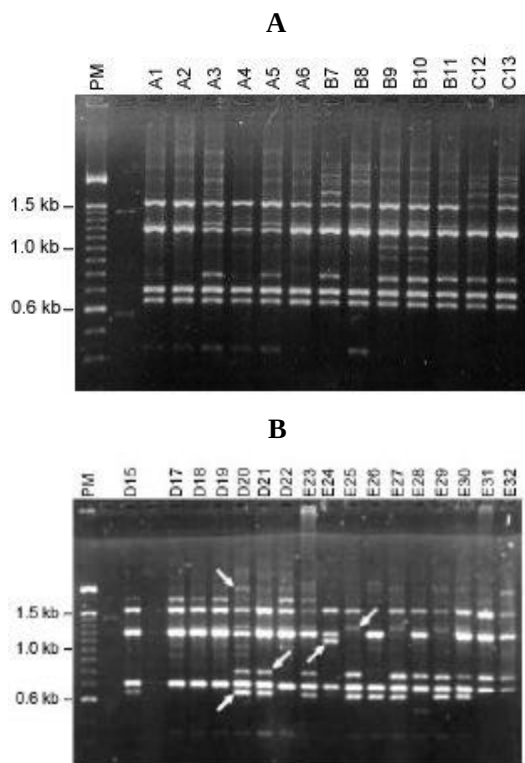


Figura 18. Marcadores moleculares de *Lonchocarpus guilleminianus* amplificados com primer OPA07. PM: Peso molecular; A₁ a A₆: indivíduos do grupo A; B₇ a B₁₁: indivíduos do grupo B; C₁₂ a C₁₃: indivíduos do grupo C; D₁₅ a D₂₂: indivíduos do grupo D; E₂₃ a E₃₂: indivíduos do grupo E. Setas: marcadores que indicam polimorfismo entre os indivíduos da população de *Lonchocarpus guilleminianus*

Através da análise dos padrões de banda obtidos pela amplificação do DNA das amostras

via SPAR, observou-se que os marcadores moleculares do tipo microsatélites não foram eficientes para análise polimórfica da população de *Lonchocarpus guilleminianus*, pois as bandas apresentaram-se bastante homogêneas, como mostra a Figura 19, resultante da amplificação do DNA de alguns grupos com primer GGAC(3)T. Apesar disto, algumas diferenças foram detectadas entre a maior parte dos indivíduos avaliados. Apenas dois indivíduos da população apresentaram perfis de banda comuns. Estes resultados demonstram que a quase totalidade da população de *Lonchocarpus guilleminianus* foi originada por reprodução sexuada.

Portanto, de acordo como os resultados obtidos através dos marcadores moleculares utilizados, há evidências suficientes que suportam a hipótese de que a reprodução sexuada em áreas desflorestadas representaria a principal estratégia reprodutiva para a ocupação de áreas desflorestadas.

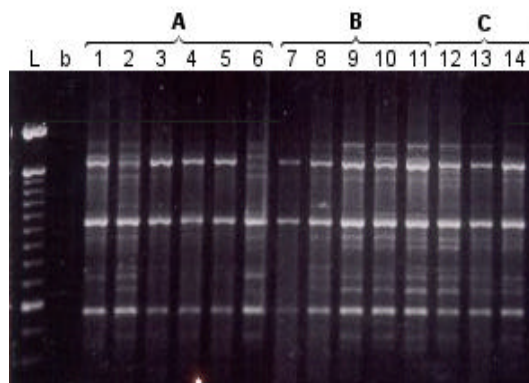


Figura 19. Marcadores moleculares SPAR com o primer GGAC3T amplificados de indivíduos de *Lonchocarpus guilleminianus*. L: ladder; b: branco; 1 a 6: indivíduos do grupo A; 7 a 11: indivíduos do grupo B; 12 a 14: indivíduos do grupo C.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, W.T. ; GRIFFIN, A.R. ; MORAN, G.F. 1992. Using paternity analysis to measure effective pollen dispersal in plant populations. *Amer. Natur.* 140: 762-780.
- AGOSTINHO, A.A.; JULIO JR. 1999. 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.
- AGOSTINHO, A.A.; JULIO JR., H.F.; BORGUETTII, J.R. 1992. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. *Revista UNIMAR* 14: 89-107.
- AGOSTINHO, A.A.; JULIO JR., H.F.; GOMES, L.C.; BINI, L.M.; AGOSTINHO, C.S. 1997. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Ed.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá, PR: Ed. Universidade Estadual de Maringá. 460 p.
- AGOSTINHO, AA.; ZALEWSKI, M. 1996. *A planície alagável do alto rio Paraná: Importância e preservação*. Editora Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.
- ALBERT, J. 1995. Phylogenetic syhstematics of the American knifefishes (Teleostei: Gymnotoidei). *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan*.
- ALBERT, J.; FERNADES-MATIOLI, F. M. C. & ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 1999. A new specie of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Telostei) from Southeastern Brazil: towards the desconstruction of *Gymnotus carapo*. *COPEIA* (1): 85-102.
- ALMEIDA, F.S. 1998. *Análise da variabilidade genética em Pimelodidae e Rhamdiidae (Pisces-Siluriformes) da bacia do rio Tibagi*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 102 p.
- BACHAMANN, L.; RUMPLER, Y., GANZHORN, J.U.; TOMIUK, J. 2000. Genetic differentiation among natural populations of *Lepilemur ruficaudatus*. *Internacional Journal of Primatology* 21: (5) 853-864.
- BARBIERI, M. C. (1981) *Contribuição ao estudo da biologia de Gymnotus carapo (Linnaeus, 1758) na Represa Lobo. Estado de São Paulo. (Pisces, Ostariophysi, Gymnotidae)*. 220p. Tese de Doutorado
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. 1994. Application of the RAPD technique in Tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73: 117-123.
- BERNARDI, L. 1985. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Viçosa: Imprensa Universitária. Vol. 2. 367p.
- BERTOLLO, L.A.C.; FONTES, M.S.; FENOCCHIO, A.S.; CANO, J. 1997 b. The X₁X₂Y Sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I, G-, C- and chromosome replication banding. (1997 b.) *Chrom. Res.* 5: 493-499.
- BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; FONTES, M.S. 1997a. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erytrinae). Cytotypes with 2n=40 chromosomes. *Brazilian Journal of Genetics* 20:237-342.
- BI, IV.; HARVENGT L.; CHANDELIER A.; MERGEAI G.; DU JARDIN P. 1996. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding* 115: 205-206.
- BIELAWSKI, J.P.; PUMO, D.E. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. *Heredity* 78: 32-40.
- BLACK, B. & ANTOLIN, M. 1997. *Explanation of RAPDIST 1.0*. Colorado State University.
- BLACK, B. 1997. *RAPDFST 4.0.1 - A FORTRAN Program to estimate F(ST) and effective migration rates among subpopulations using RAPD-PCR files*. Colorado State University.
- BLACK, B. 1997. *RAPDPLOT 3.0*. Colorado State University.
- BLACK, B.; ANTOLIN, M. 1997. *Explanation of RAPDIST 1.0*. Colorado State University.
- BORIN, L. A.; JÚLIO JR., H. F. 1994. Ocorrência de

- um novo citótipo de *Gymnotus carapo* (SILURIFORMES – Gymnotoidei) no alto rio Paraná. IN: *V Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais*. Botucatu: UNESP.
- CAGIGAS, M.E.; VAZQUEZ, E.; BLANCO, G.; SÁNCHEZ, J.A. 1999. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites, and RAPD markers. *Mar. Biotechnol.* 1: 286-296.
- CALLEJAS, C.; OCHANDO, M. D. 1998. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *Journal of Fish Biology.* 53, 208-215.
- CAMPUS, B. C.; SOUZA, M. C. 1997. *Vegetação*. In: Vazzoler et al. (Eds.) *A planície de inundação do alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM/NUPÉLIA. p.331-341.
- CRAMPTON, W. G.R. 1996. Gymnotiformes fish: na important component of Amazonian floodplain fish communities. *Journal of Fish Biology.* 48, 298-301.
- CRONQUIST, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press. USA. 1262p.
- DERGAN, J.C.; BERTOLLO, L.A.C. 1990. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná Basis. *Brazilian Journal of Genetics* 13: 755-766.
- DERGAN, J.C.; SUZUKI, H.I.; SHIBATTA, O.A.; DUBOC, L.F.; JÚLIO JR., H.F.; GUILIANO CAETANO, L.; BLACK IV, W.C. 1998. Molecular biogeography of the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguazu, Tibagi, and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology* 21:493-496.
- DIAS, L.A.S. 1998. Análises multidimensionais. In *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Edited by A.C. ALFENAS. Editora UFV, Viçosa, MG.
- EDWARDS, A.; HAMMOND, H.A.; JIN. L.; CASKEY, C.T.; CHAKRABORTY, R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12: 241-253.
- FELSENSTEIN, J. (1993) *PHYLIP: (phylogeny inference package) version 3.5c*. University of Washington, Seattle, Washington.
- FERNANDES-MATIOLI, F. M. 1999. *Evolução e Estrutura de Populações no Gênero Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes). São Paulo: Universidade de São Paulo. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências).
- FERNANDES-MATIOLI, F. M. 1999. *Evolução e Estrutura de Populações no Gênero Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes). São Paulo: Universidade de São Paulo. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências).
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p.
- FINK, W.I.; FINK, S. 1978. A Amazônia Central e seus peixes. Supl. *Acta Amazonica* 8: 19-42.
- FUGI, R. 1993. *Estratégias alimentares utilizadas por cinco espécies de peixes comedoras de fundo do Alto Paraná/PR-MS*. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- FUTUYMA, D.J., 1997. *Biologia Evolutiva*. 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP.
- GUPTA, M; CHYI, Y-S; ROMERO-SEVERSON, J.V.; OWEN, J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primer of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998-1006.
- HACKETT, C.A.; WACHIRA, F.N.; PAUL, S., POWELL, W.; WAUGH, R. 2000. Construction of a genetic linkage map for *Camellia sinensis* (tea). *Heredity* 85: (4) 346-355.
- HOLLINGSWORTH, M.L.; BAILEY, J.P. 2000. Evidence for massive clonal growth in the invasive weed *Fallopia japonica* (Japanese Knotweed). *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 463-472.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human

- DNA. *Nature* 316: 76-79.
- JEFFREYS, A.J.; ROYLE, N.J.; WILSON, V. 1985. Spontaneous mutation rates to new alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* 322: 278-281.
- JOLY, A. B. 1975. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Editora Nacional. 777p.
- LAWRENCE, G. H. M. 1951. *Taxonomia das Plantas Vasculares*. V.2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 578p.
- LEGENDRE, P.; ANDERSON, M. J. 1998. *Program DistPCoA*. Département de sciences biologiques, Université de Montréal. 10 pages.
- LEGENDRE, P.; ANDERSON, M.J. 1999. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* 69: 1-24.
- LEITÃO FILHO, H.F. 1987. *Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais*. Bol. IPEF, Piracicaba, v. 35,p.
- LITT, M.; LUTY, J. A. 1989. A Hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Gen.* 44: 398-401.
- LORENZI, H. 1998. *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum. Vol.1 e 2. 352p.
- LYNCH, M., MILLIGAN, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- MAGGO-LECCIA, F. 1994. *Electric fishes of the continental water of América* – Classification and catalogue of the electric fishes of the order Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi), with descriptions of new genera and species. Caracas, Venezuela. Fundacion para el desarrollo de las Ciencias Fisicas, Matematicas y Naturales. Vol. XXIX
- MAMURIS, Z.; STAMATIS, C.; TRIANTAPHYLIDIS, C. 1999. Intraspecific genetic variation of striped red mullet (*Mullus surmuletus* L.) in the Mediterranean Sea assessed by allozyme and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Heredity* 83: 30-38.
- MANIGLIA, T.C.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; PAZZA, R.; JÚLIO JR, H. F.; PERIOTO, P.S.; OLIVEIRA, A.V.. 2000. Polimorfismo molecular em populações de *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) da planície de inundação do alto rio Paraná. *Genetics and Molecular Biology - Supplement*. 23: 103-104.
- MANTOVANI, W. 1989. Conceituação e fatores condicionantes. In: BARBOSA, L.M. (Ed.). Anais do Simpósio sobre Mata Ciliar realizado em São Paulo, SP. Campinas: Fundação Cargill. P. 11-19.
- MORELLI, S. 1998. Citogenética Evolutiva em Espécies do Gênero *Hoplias*, grupo lacerdae. Macroestrutura Cariotípica, Heterocromatina e Regiões Organizadora de Nucléolo. São Carlos: UFSCar. 76p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A.; SCHARF, S.J.; SAIKI, R.K.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids. Res.* 8: 4321-4325.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. USA* 70: 3321-3323.
- NEI, M.; LI, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76: 5269-5273.
- NELSON, J. S. 1994. *Fishes of the World*. 3° ed., John Wiley & Sons, Inc., USA.
- OBORNIK, M.; KLIC, M.; ZISKA, L. 2000. Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 78: (9) 1150-1155.
- PARTIS, L.; WELLS, R. J. (1996). Identification of fish species using amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes*. 10, 435-441.
- PAVANELLI, C.S.; BRITSKI, H.A. 1999.

- Description of a new species of *Steindachnerina* (Teleostei: Characiformes: Curimatidae) from the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 10: 211-216.
- PENNINGTON, T. D. 1997. The genus *Inga*. Botany. The Royal Botanic Garden, Kew.
- POREBSKI, S.; BAILEY L.G.; BAUM B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 8-15.
- POTT, A; POTT, V.J. 1994. Plantas do Pantanal. Brasília: EMBRAPA. 320p.
- RAISSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. 1991. Isolation of fingerprinting. *Elektrophoresis* 12: 113-118.
- RIZZI, N.E. 1963. Função da floresta na manutenção da qualidade da água para o uso humano. *Rev. Floresta*: 54-65, 1981.
- RODRIGUES, R.R. 1991. Análise de um remanescente de vegetação natural às margens do rio Passa Cinco, Ipeúna, SP. Campinas: UNICAMP. 325 p. tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas.
- ROMAGNOLO, M. B.; SUZA, M. C.; FERRUCCI, M. S. 1994. Sapindaceae da planície de inundação do trecho superior do rio Paraná. *Revista Unimar* 16: 61-81.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN. K. M.; JORGENSEN, A R.; ALLARD, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 8014-8018.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS, 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SCHLÖTTER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature* 354: 63-65.
- SEKINE, E. S. 2000. Distância genética e fluxo gênico entre populações de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Siluriformes) isoladas pelos Saltos de Sete Quedas do rio Paraná. Dissertação de Mestrado. Maringá.
- SNEATH, P.H.A. AND SOKAL, R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman and Co, San Francisco.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman and Co, San Francisco.
- SOUZA, D.C.; SOUZA, M.C. 1998. Levantamento das tribos Cinchoneae, Coussareae e Morindeae (Rubiceae) da planície de inundação do alto rio Paraná, região de Porto Rico. *Acta Scientiarum*
- SOUZA, M. C. 1999. Algumas considerações sobre vegetação ripária. *Biodiversidade* 2 (no prelo).
- SOUZA, M. C.; CILINSKI, J.; ROMAGNOLO, M. B. 1997. Levantamento florístico. In: VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Eds.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM/NUPELIA. p. 345-370.
- SOUZA, M.C. 1998. *Estrutura e composição florística da vegetação de um remanescente florestal da margem esquerda do rio Paraná (Mata do Araldo, Município de Porto Rico, PR)*. Rio Claro: UNESP. 172 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências.
- SPIETH, P.T. (1974). Gene flow and genetic differentiation. *Genetics* 78: 961-965.
- TAGGAR, L.B.; FERGUSON, A 1991. Hypervariable minisatellite DNA single locus probes for the Atlantic salmon, *Salmo solar* L. *Journal of Fish Biology* 37: 991-993.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences of a general source for polymorphic DNA makers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components or eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12: 4127-4138.
- TEL-ZUR, N.; ABBO, S.; MYSLABODSKI, D.; MIZRAHI, Y. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 249-254.
- THOMAZ, S. M; ROBERTO, M. C. & BINI, L.

- M.1997. Caracterização limnológica dos ambientes aquáticos e influência dos níveis fluviométricos. 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, PR: Ed. Universidade Estadual de Maringá. 460 p.
- THORPE, J.P. 1982. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13: 139-168.
- THORPE, J.P.; A.M. SOLÉ-CAVA, 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zool. Sci.* 23: 3-18.
- VARI, R.P., 1991. Systematics of the Neotropical Characiform genus *Steindachnerina* Fowler (Pisces: Ostariophysi). *Smithson. Contr. Zool.* 507: 1-118.
- VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Eds.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM-NUPELIA.
- VENERE, P.C.; P.M. GALETTI JR. 1989. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the Curimatidae. *Brazilian Journal of Genetics* 12: 17-25.
- WEBER, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n, (dG-dT)_n polymorphism. *Genomics* 7: 524-530.
- WEBER, J.L.; MAY, P.E. 1989. Abundant calss of human DNA polymorphis which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Gen.* 44: 388-396.
- WEIR, B.S., 1990. *Genetic data analysis; methods for discrete population genetic data*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primer. *Nucleic Acids Res.* v. 18. p: 7013-7218.
- WHITMORE, D.H.; THAI, T.H.; CRAFT, C.M. 1992. Gene amplification permits minimally invasive analysis of fish mitochondrial DNA. *Transactions of the American Fisheries Society*. 121: 170-177.
- WILLIAMS, D.J., KAZIANIS, S.; WALTER, R.B. 1998. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of largemouth bass subspecies and their intergrades. *Transactions of the American Fisheries Society* 127: 825-832.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, J.; RAFALSKI, J.A.;TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- WONG, A.K.; YEE, H.A; VAN de SANDE, J.H.; ROTTER, J.B. 1990. Distribution of CT-rich tracts inversed in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 344-351.
- WORKMAN, P.L.; NISWANDER, J.D. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes. II.. Local genetic differentiation in the Papago. *Am. J. Hum. Genet.* 22: 24-49.
- YANG, H.; GOLENBERG, E.M.; SHOSHANI, J. 1997. Proboscidean DNA form museum and fossil speciemens: An assessment of ancient DNA extraction and amplification techniques. *Biochemical Genetics* 35: 165-179.
- ZAR, J.H., 1974. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs, Prentice-Hall.