

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE AMBIENTES**  
**AQUÁTICOS CONTINENTAIS**

**VARIABILIDADE GENÉTICA, EVIDENCIADA POR**  
**MARCADORES NUCLEARES E DO GENOMA**  
**MITOCONDRIAL, DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Brycon***  
**(CHARACIFORMES: CHARACIDAE) DE TRÊS BACIAS**  
**HIDROGRÁFICAS**

**Renata de Souza Panarari**

**Maringá - Paraná**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**RENATA DE SOUZA PANARARI**

**VARIABILIDADE GENÉTICA, EVIDENCIADA POR  
MARCADORES NUCLEARES E DO GENOMA MITOCONDRIAL,  
DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Brycon* (CHARACIFORMES:  
CHARACIDAE) DE TRÊS BACIAS HIDROGRÁFICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais.

**Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli**

**Maringá - Paraná**

**2006**

## Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
CAPÍTULO 1.....	11
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
Área de estudo.....	16
Material biológico.....	16
Extração e quantificação do DNA genômico.....	18
RAPD e análise dos dados.....	18
DNA mitocondrial e análise dos dados.....	19
RESULTADOS.....	20
RAPD.....	20
DNA mitocondrial.....	24
DISCUSSÃO.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO 2.....	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
Área de estudo.....	40
Reservatório de Itaipu.....	40
Bacia do rio Paraguai.....	40
Material biológico.....	40
Extração e quantificação do DNA genômico.....	41
RAPD e análise de dados.....	42
DNA mitocondrial e análise de dados.....	43
RESULTADOS.....	44
RAPD.....	44
DNA mitocondrial.....	44
DISCUSSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
CAPÍTULO 3.....	58
RESUMO.....	58
ABSTRACT.....	59
INTRODUÇÃO.....	60
MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
Área de estudo.....	62
Material biológico.....	63
Extração e quantificação do DNA genômico.....	64
ISSR e análise dos dados.....	65
Região espaçadora do DNAr 5S e análise de dados.....	66
DNA mitocondrial e análise de dados.....	66
RESULTADOS.....	67
ISSR.....	67
Região espaçadora do DNAr 5S.....	68
DNA mitocondrial.....	69

DISCUSSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

## INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Brycon* pertence à subfamília Bryconinae e é considerado um dos principais peixes neotropicais de água doce. É constituído por cerca de 40 espécies (Lima, 2003), amplamente distribuídas na América Central e do Sul. Muitas delas destacam-se pela sua importância na atividade pesqueira. No Brasil, espécies deste gênero podem ser encontradas na maior parte das bacias hidrográficas, tais como a bacia Amazônica, do Paraná, do Paraguai e do Araguaia-Tocantins. O presente estudo abrange três espécies pertencentes a três destas bacias. *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850), originária da bacia do rio Paraná, cuja população estudada é do alto rio Paraná. *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850) ocorre nas bacias do médio rio Paraná e rio Paraguai e foram estudadas populações de ambas as localidades. *Brycon cf. pesu* Müller & Troschel, 1845 distribui-se desde as bacias costeiras do nordeste da América do Sul, bacia do rio Orinoco e bacia Amazônica, incluindo a bacia do Araguaia-Tocantins (Lima, 2003). Neste trabalho foi estudada a população identificada como *Bycon cf. pesu* nativa da bacia do Araguaia-Tocantins.

*Brycon orbignyanus*, conhecida como piraicanjuba, é uma espécie migradora, de grande porte, podendo atingir um comprimento total de até 79,5 cm (Godoy, 1975). Suas populações eram abundantes na bacia do alto rio Paraná, na calha do rio Paraná e em seus principais tributários, como o rio Grande, Tietê e Paranapanema. No entanto, atualmente se encontra na categoria “criticamente em perigo” (Machado, 2005). Seu desaparecimento está relacionado à construção de barragens, destruição da mata ciliar e pesca predatória.

*Brycon hilarii*, conhecida como piraputanga, assim como a piraicanjuba, é um peixe reofílico, de grande importância na atividade pesqueira. Possui hábitos onívoros, vive em locais de corredeiras e nos remansos, embaixo de árvores frutíferas e próximas às plantas aquáticas. Seu comprimento total pode chegar a 56 cm (IGFA, 2001).

*Brycon cf. pesu*, também conhecida como “beiradeira”, é um peixe de pequeno porte, que atinge até 12 cm de comprimento padrão (Lima, 2003). Ocorre sobre areias e rochas, em águas correntes rápidas (Planquette *et al.*,

1996). Tem o hábito característico de se alimentar nas margens, principalmente de insetos terrestres.

A crítica redução populacional de algumas espécies de peixes, como é o caso da piracanjuba, com conseqüente perda de diversidade genética populacional poderia torná-la ainda mais vulnerável. De modo geral, as espécies são constituídas por várias populações que potencialmente trocam genes. Se todas as populações da espécie, ou de uma região, são semelhantes geneticamente, o conjunto é uma única população geneticamente homogênea. No entanto, baixo fluxo gênico, endogamia e deriva genética podem promover divergências genéticas significativas entre as populações. Nesta condição, a população está geneticamente estruturada, isto é, subdividida em populações diferenciadas. O estudo da genética populacional gera conhecimentos sobre a estruturação e informações imprescindíveis para o estabelecimento de estratégias conservacionistas de avaliação e preservação ambiental.

As análises de DNA realizadas com técnicas moleculares têm sido de grande utilidade para programas de conservação da biodiversidade. Um dos conceitos unificadores dessa interação é a ESU (*Evolutionary Significant Unity*), adotado pela *U.S. Endangered Species Act*. Uma ESU pode ser definida como uma população ou um grupo de populações que está reprodutivamente isolada de outras unidades populacionais relacionadas. Além disso, representa um importante componente no legado evolutivo da espécie (Waples, 1995). Portanto, os objetivos da proteção da diversidade biológica estão além da definição tradicional de espécie e abrangem unidades biológicas e genéticas menores (Allendorf, 1995; Nielsen & Powers, 1995; Waples, 1995; Smith & Wayne, 1996; Hedrick, 2001). A biodiversidade genética detectada nos peixes tropicais não se encontra espalhada ao acaso dentro da área geográfica onde vive historicamente uma determinada espécie, mas está contida nos chamados Bancos Genéticos Selvagens (Smith & Wayne, 1996; Toledo-Filho *et al.*, 1999). O conhecimento e a manutenção da integridade genética de subunidades populacionais ou populações locais são aspectos fundamentais em programas de preservação e manejo da espécie.

O legado evolutivo de uma espécie é a variabilidade genética, também conhecida como biodiversidade molecular. O conhecimento e a manutenção da integridade genética de subunidades populacionais ou populações locais é um

dos aspectos fundamentais em programas de preservação e manejo da espécie. Entretanto, os critérios, medidas e avaliações para distinguir populações não estão consolidados. Por exemplo, como saber qual nível de diferenciação caracteriza uma ESU? A biologia molecular poderá indicar o grau de divergência genética entre populações, mas não poderá afirmar se tal divergência caracteriza uma ESU. Portanto, os resultados obtidos com as técnicas moleculares nunca devem ser considerados auto-suficientes, mas analisados em conjunto com dados morfológicos ou de outra natureza nos estudos de populações. A aplicação da biologia molecular tem sido útil na identificação de ESUs, mas sua eficácia aumenta quando associada a outras análises (Allendorf, 1995; Waples, 1995; Smith & Wayne, 1996; Hedrick, 2001).

A possibilidade de quantificar a variabilidade genética pela análise direta de polimorfismos de fragmentos de DNA impulsionou a genética de populações e a genética do processo evolutivo. O polimorfismo do DNA, associado aos estudos morfológicos e ecológicos, já tem sido demonstrado como capaz de contribuir fortemente no reconhecimento da diversidade genético-ecológica e na genética do processo evolutivo de espécies e subespécies. A amplificação de seqüências de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o seqüenciamento de nucleotídeos de DNA são as metodologias com maior destaque. Marcadores nucleares como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SPAR (*Single Primers Amplifications Reactions*), e seqüências do DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) têm comprovadamente se mostrado úteis em estudos de estrutura genética de populações, relações filogeográficas e reconstrução filogenética em peixes (Fernandes-Matioli *et al.*, 2000; Martin & Bermingham, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2000; Sivasundar *et al.*, 2001; Turgeon & Bernatchez, 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Prioli *et al.*, 2002; Hrbek *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2004; Duftner *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Perdices *et al.*, 2005; Hatanaka *et al.*, 2006; Sofia *et al.*, 2006; Theodorakis *et al.*, 2006). Além disso, também podem ser utilizados em estudos relacionados com a conservação e a introdução de espécies, e em problemas relacionados à taxonomia. São estes três tópicos que serão abordados no presente trabalho, cada um referente a uma espécie pertencente ao gênero *Brycon*.

As citações e referências bibliográficas seguem as recomendações do periódico *Journal Fish Biology*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allendorf, F.W. (1995). Genetics. In: *Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining Unique units in population conservation*. (Nielsen J.L., ed.). Maryland: American Fisheries, Bethesda.

Duftner, N., Koblmüller, S., Weiss, S., Medgyesy, N. & Sturmbauer, C. (2005). The impact of stocking on the genetic structure of European grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in two alpine rivers. *Hydrobiologia* **542**, 121-129.

Fernandes-Matioli, F.M.C., Matioli, S.R. & Almeida-Toledo, L.F. (2000). Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)<sub>n</sub> microsatellite analysis. *Genetics and Molecular Biology* **23** (4), 803-807.

Godoy, M.P. (1975). *Peixes do Brasil. Subordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi Guassu*. Vol. II. Piracicaba: Franciscana. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em : 27 oct. 2006.

Hatanaka, T., Henrique-Silva, F. & Galetti, P.M. (2006). Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the Sao Francisco River. *Genetica* **126** (1-2), 153-159.

Hedrick, P.W. (2001). Conservation Genetics: Where are we now? *Trends in Ecology & Evolution* **16** (11), 629-636.

Hrbek, T., Stolting, K.N., Bardakci, F., Kucuk, F., Wildekamp, R.H. & Meyer, A. (2004). Plate tectonics and biogeographical patterns of the *Pseudophoxinus* (Pisces : Cypriniformes) species complex of central Anatolia, Turkey. *Molecular Phylogenetics and evolution* **32** (1), 297-308.

IGFA. (2001). Database of IGFA angling records until 2001. IGFA, Fort Lauderdale, USA. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em : 27 oct. 2006.

Lima, F.C.T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). (2003). In: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. (Reis R.E., Kullander S.O. & Ferraris Jr. C.J., ed.), pp. 174-181. Porto Alegre: EDIPUCRS.

Liu, H.Z., Zhu, Y.R., Wang, J.W. & Tan, D.Q. (2005). Population genetic structure of an endemic cyprinid fish, *Ancherythroculter nigrocauda*, in the upper reaches of the Yangtze River and its implication for conservation. *Korean Journal of Genetics* **27** (4), 361-367.

Machado, A.B.M. (2005). *Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados* (Machado A.B.M., Martins, C.S & Drummond, G.M., ed.). 160p. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.

Martin, A.P. & Bermingham, E. (2000). Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical catfish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **267** (1448), 1135-1141.

Nielsen, J.L. & Powers, D.A. (1995): Introduction. In: *Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining Unique units in population conservation*. (Nielsen J.L., ed.). Maryland: American Fisheries, Bethesda.

Oliveira, A.V., Prioli, A.J., Prioli, S.M.A.P., Pavanelli, C.S., Julio Jr., H.F. & Panarari, R.S. (2002): Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. *Genetica* **115**, 259-267.

Perdices, A., Sayanda, D. & Coelho, M.M. (2005). Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* (Teleostei, Cyprinidae) in three Chinese drainages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37** (3), 920-927.

Planquette, P., Keith, P. & Le Bail, P.-Y. (1996). Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome 1). Collection du Patrimoine Naturel, vol.22. IEGB-M.N.H.N., INRA, CSP, Min. Env., Paris. 429 p. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em : 27 oct. 2006.

Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J., Julio Jr, H.F., Pavanelli, C.S., Oliveira, A.V., Carrer, H., Carraro, D.M. & Prioli, L.M. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* **25** (4), 421-430.

Schulz, H.K., Smietana, P. & Schulz, R. (2004). Assessment of DNA variations of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in Germany and Poland using inter-

simple sequence repeats (ISSRs). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **372-73**, 387-399.

Sivasundar, A., Bermingham, E. & Orti, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* **10** (2), 407-17.

Smith, T.B. & Wayne, F.W. (1996): Molecular Genetic Approaches in Conservation. Oxford Univ. Press. New York, 483 p.

Sofia, S.H., Silva, C.R.M., Galindo, B.A., Almeida, F.S., Sodr , L.M.K., Martinez, C.B.R. (2006). Population genetic structure of *Astyanax scabripinis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia* **553**, 245-254.

Theodorakis, C.W., Lee, K.L., Adams, S.M. & Law, C.B. (2006). Evidence of altered gene flow, mutation rate, and genetic diversity in redbreast sunfish from a pulp-mill-contaminated river. *Environmental Science & Technology* **40** (1), 377-386.

Toledo-Filho, S.A., Calcagnoto, D., Bernardino, G., Fernandes-Matioli, F.M.C., Moys s, C.B., Almeida-Toledo, L.F. & Foresti, F. (1999): Projeto de Bancos Genéticos na Piscicultura Brasileira. In: *Cadernos de Ictiogen tica*. vol. 5. São Paulo: USP.

Turgeon, J. & Bernatchez L. (2001). Mitochondrial DNA phylogeography of lake cisco (*Coregonus artedii*): evidence supporting extensive secondary contacts between two glacial races. *Molecular Ecology* **10** (4), 987-1001.

Yamaguchi, M., Miya, M., Okiyama, M. & Nishida, M. (2000): Molecular phylogeny and larval morphological diversity of the lanternfish genus *Hygophum* (Teleostei: Myctophidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **15** (1), 103-14.

Waples, R.S. (1995). Evolutionary significant units and the conservation of biological diversity under the endangered species act. In: *Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining Unique units in population conservation*. (Nielsen J.L., ed). Bethesda, Maryland: American Fisheries Society.

# CAPÍTULO 1

## VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Characidae) EM POPULAÇÕES CULTIVADA E NATURAL DO ALTO RIO PARANÁ E IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE.

### RESUMO

Alterações provocadas nos ambientes aquáticos pelo intenso represamento dos rios têm ameaçado várias espécies aquáticas, inclusive peixes migratórios de grande porte. *Brycon orbignyanus*, conhecida como piracanjuba, é uma destas espécies e já se encontra na categoria “criticamente em perigo”. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética da piracanjuba em populações cultivada e natural do alto rio Paraná, através do uso de marcadores moleculares RAPD e região controle do DNAm. Exemplares de *B. orbignyanus* foram coletados no rio Paraná e na estação de piscicultura Piracema, em Maringá-PR. Com a técnica RAPD, foram analisados 28 indivíduos do rio Paraná e 26 de estoque de piscicultura. Os nove *primers* selecionados produziram 82 locos RAPD com expressão consistente. A população do rio Paraná apresentou 28 locos polimórficos, enquanto a proveniente de piscicultura apresentou apenas 12. As estimativas do índice de fixação molecular  $F_{ST}$  (0,2026;  $p= 0,000$ ) e teste de Mantel (0,3970;  $p= 0,0001$ ) demonstraram diferenciação genética entre as duas populações, embora pouco acentuada. Estes resultados foram corroborados pela análise em coordenadas principais e pelo agrupamento *neighbor-joining*. O valor do índice de diversidade molecular foi maior para a população do rio Paraná ( $IM = 0,2691$ ), indicando que a mesma é geneticamente mais variável que a população de piscicultura ( $IM = 0,1196$ ). O alinhamento das seqüências *D-loop* de *B. orbignyanus* mostrou que há polimorfismo apenas dentro da população de ambiente natural. Estes resultados refletem uma prática comum utilizada em programas de piscicultura, que utilizam baixo número de matrizes, o que tende a diminuir a variabilidade genética das gerações obtidas. Como a piracanjuba está seriamente ameaçada de extinção, estes dados podem subsidiar

formulação de estratégias de manejo e conservação da diversidade genética da espécie.

## ABSTRACT

Several aquatic species, including large migratory fishes, have been threatened by changes in aquatic environments caused by intense construction of dams in rivers. Popularly known as piracanjuba, *Brycon orbignyanus* is a species already on the critically threatened list. Current research aims at evaluating the genetic variability of the piracanjuba in cultured and natural populations from the upper Paraná River by molecular RAPD markers and mtDNA control region. Samples of *Brycon orbignyanus* were collected at the Paraná River and at the Piracema fish culture station in Maringá-PR, Brazil. Twenty-eight specimens from the Paraná River and 26 from the fish station were analyzed by RAPD technique. Selected 9 primers produced 82 RAPD loci with consistent expressions. Whereas population from the Paraná River showed 28 polymorphic sites, the fish station population showed only 12. Estimates by molecular fixation index  $F_{ST}$  (0.2026;  $p= 0.000$ ) and Mantel's test (0.3970;  $p= 0.0001$ ) presented low key genetic differentiation between the two populations. Results have been corroborated by principal coordinates analysis and by neighbor-joining grouping. Molecular diversity index is higher for the Paraná River population ( $IM = 0.2691$ ), and shows that it is genetically more variable than that from the fish station ( $IM = 0.1196$ ). *Brycon orbignyanus*'s D-loop sequence alignment reveals the existence of polymorphism only in the population living in its natural environment. Results show a common practice in fish culture programs, or rather, owing to the deployment of a low number of matrixes, genetic variability of subsequent generations tends to decrease. Since piracanjuba is seriously threatened, above data may help in management strategies and in the conservation of the species's genetic diversity.

## INTRODUÇÃO

Alterações nos ambientes aquáticos têm levado a inúmeras conseqüências para as populações de peixes. A bacia hidrográfica do rio Paraná, por exemplo, tem sido afetada pelo intenso represamento dos seus principais rios, pela redução da mata ciliar e pesca predatória. Tais fatores combinados têm contribuído severamente para o decréscimo de populações e até para o desaparecimento de peixes migratórios de grande porte. A interrupção das rotas migratórias dessas espécies, com fragmentação dos ambientes naturais e substituição de ambientes lóticos por lênticos, é, em grande parte, responsável pela extinção dos migradores (Sirol & Britto, 2005). Na bacia do alto Paraná, temos alguns exemplos de peixes migradores, cuja presença atualmente é rara, tais como: *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado), *Zungaro zungaro* (jaú) e *Salminus brasiliensis* (dourado).

O gênero *Brycon* compreende cerca de 40 espécies (Lima, 2003), as quais estão amplamente distribuídas por sistemas hidrográficos brasileiros, com algumas espécies já ameaçadas de extinção. *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850), conhecida como piracanjuba, é uma destas espécies ameaçadas (Agostinho *et al.*, 1997) e já se encontra na categoria “criticamente em perigo” (Machado, 2005). A piracanjuba era freqüente na bacia do rio Paraná, mas tornou-se rara e não tem sido mais encontrada nos rios Tietê, Grande e Paranapanema.

*Brycon orbignyanus* (Fig. 1) é nativa das bacias do rio Paraná e Uruguai (Borba *et al.*, 2003). Possui hábitos alimentares onívoros, é reofílica, e possui alto valor comercial. É uma espécie de grande porte, atingindo até 79,5 cm de comprimento total (Godoy, 1975). Além disso, é altamente dependente da presença de mata ciliar para a alimentação. Além de constituírem barreiras físicas para a migração reprodutiva, uma das conseqüências do barramento dos rios é a eliminação das matas ciliares nos reservatórios e de grandes extensões dos afluentes alagados. A crítica redução populacional de *B. orbignyanus* é preocupante pela diminuição do número de indivíduos e pela conseqüente perda de diversidade genética populacional, o que poderia torná-la ainda mais vulnerável. Portanto, a existência de *B. orbignyanus*, em ambiente natural, tem sido ameaçada tanto em nível reprodutivo como pela

redução drástica da disponibilidade de alimentos (Agostinho *et al.*, 1994; Agostinho & Júlio Jr., 1999).



**Figura 1.** *Brycon orbignyanus* proveniente do rio Paraná (comprimento padrão: 270 mm).

Fonte: Graça & Pavanelli, 2006.

Com o advento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) várias metodologias se tornaram disponíveis para quantificar a variabilidade genética pela análise de polimorfismos de fragmentos de DNA. Tais polimorfismos, associados aos estudos morfológicos e ecológicos têm contribuído fortemente no reconhecimento da diversidade genético-ecológica. A amplificação de seqüências de DNA via PCR e o seqüenciamento de nucleotídeos de DNA são as metodologias com maior destaque. Marcadores nucleares como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), e seqüências do DNA mitocondrial (DNAmt) têm comprovadamente se mostrado úteis em estudos de estrutura genética de populações, relações filogeográficas e reconstrução filogenética em peixes (Sivasundar *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005; Lage & Kornfield, 2006; Sofia *et al.*, 2006).

Na técnica RAPD, fragmentos de DNA são amplificados por PCR, com *primers* curtos de seqüências nucleotídicas arbitrárias (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990). O *primer* anela-se ao DNA em um ou mais locais, permitindo a amplificação das regiões intermediárias aos sítios de anelamento dos *primers* utilizados. Os fragmentos amplificados são marcadores genéticos.

Várias regiões do DNA mitocondrial são utilizadas em estudos de populações e a escolha depende do objetivo. A região controle, ou *D-loop*, é a mais variável do DNAmt de metazoários (Saccone *et al.*, 2002). Este é o melhor trecho do DNAmt para estudos genético-populacionais e evolutivos



entre espécies muito próximas e entre populações de uma espécie (Sivasundar *et al.*, 2001; Prioli *et al.*, 2002; Hunnicutt *et al.*, 2005).

Estudos moleculares têm sido realizados com várias espécies do gênero *Brycon* (Wasko & Galetti, 2002; Barroso *et al.*, 2003; Wasko & Galetti, 2003; Wasko *et al.*, 2004). No entanto, existem poucos estudos genéticos com *B. orbignyana*, sendo necessários aqueles que avaliem a diversidade genética de suas populações naturais, para que possam ser utilizados em programas de conservação da espécie.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de *B. orbignyana* em populações cultivada e natural do alto rio Paraná, através do uso de marcadores moleculares RAPD e seqüências da região variável *D-loop* do DNAm. Os dados obtidos poderão fornecer subsídios para futuros programas de conservação da espécie.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Área de estudo***

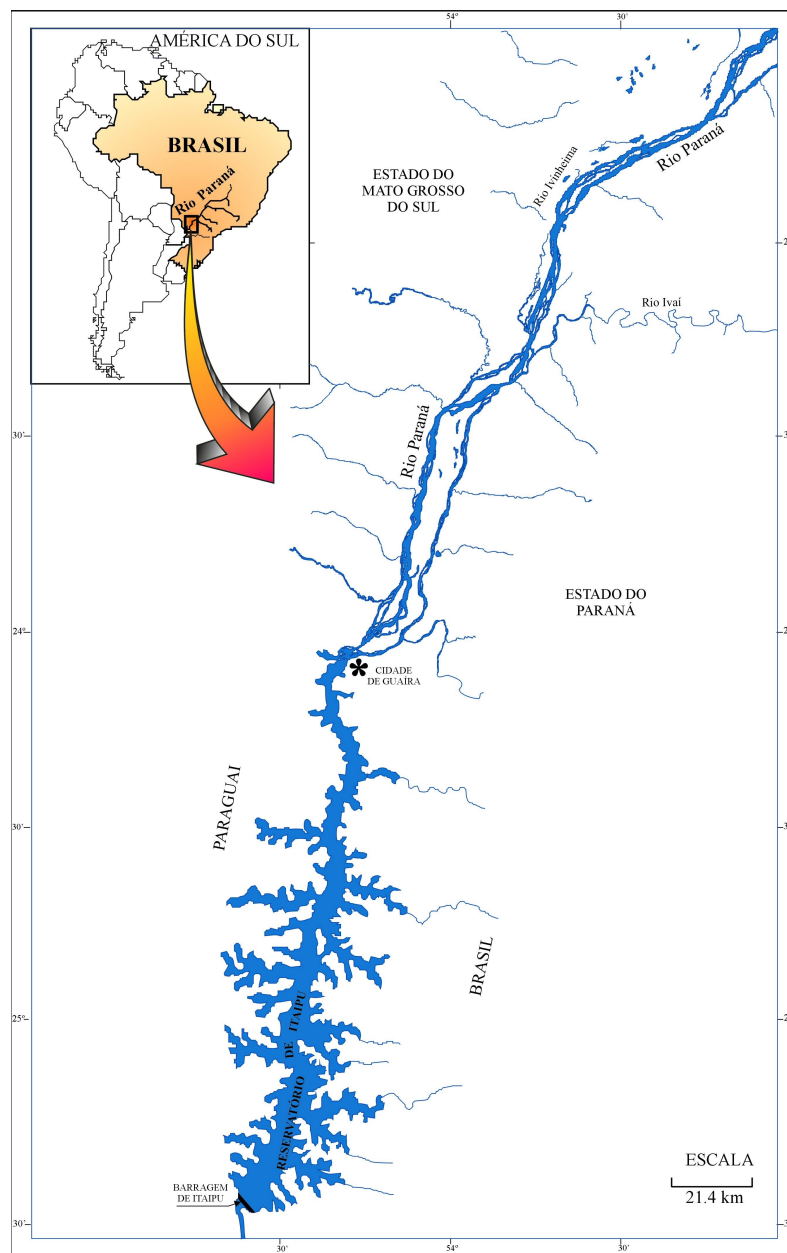
O rio Paraná é formado pela confluência dos rios Paranaíba e Grande. É o segundo rio em extensão na América do Sul e o décimo do mundo em vazão. Sua bacia abrange mais de 10% do território nacional incluindo parte dos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná. Seus principais tributários são os rios Tietê, Paranapanema, Iguaçu e Paraguai.

Entre os municípios de Guaíra e Foz do Iguaçu, no Estado do Paraná, ocupa 170 quilômetros de trecho contíguo aos territórios brasileiro e paraguaio, onde foi formado o reservatório para o aproveitamento hidrelétrico de Itaipu. A jusante de Itaipu, segue seu curso fazendo divisa entre Argentina e o Paraguai até receber seu maior afluente, o rio Paraguai, formando juntamente com o rio Uruguai a bacia do Prata ([http://www.achetudoeregiao.com.br/PR/rio\\_parana.htm](http://www.achetudoeregiao.com.br/PR/rio_parana.htm)).

### **Material biológico**

Exemplares de *B. orbignyana* foram coletados no rio Paraná, na região de Guaíra (Fig. 2) e na estação de piscicultura Piracema, em Maringá-PR. De acordo com os fornecedores da estação de piscicultura, o estoque obtido é

proveniente de reprodutores coletados no rio Baía (22°43'S; 53°19'W). Este rio está localizado na planície de inundação do rio Paraná, com curso norte sul paralelo a margem direita do rio Paraná, no Mato grosso do sul. Tecidos de músculo foram preservados em álcool comercial. Material testemunho de *B. orbignyanus* do rio Paraná (Nup 249, 1525, 1557, 2473,) é encontrado na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura, da Universidade Estadual de Maringá.



**Figura 2.** Área de estudo no rio Paraná.

## Extração e quantificação do DNA genômico

A extração de DNA foi efetivada com utilização da metodologia baseada em fenol/clorofórmio (Monesi *et al.*, 1998). Amostras de tecido muscular, com cerca de 100 mg, foram maceradas em nitrogênio líquido. Ao extrato obtido adicionou-se tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Espermidina 0,15 mM), tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%) e proteinase K (20 µg/µL). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria com agitação, a 37 °C por cerca de uma hora. Após, efetuou-se a purificação do DNA através de lavagens com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio. Na etapa seguinte, o DNA foi precipitado com solução salina (NaCl 0,2 M) e etanol gelado. Este precipitado foi submetido a várias centrifugações com etanol 70% e 100% e finalmente ressuspensão em TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) contendo RNase. Posteriormente o DNA de todas as amostras foi quantificado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL). Essencialmente, a quantificação consistiu na comparação do DNA contido em 1 µL de cada amostra com quantidades conhecidas de DNA do fago λ (Invitrogen).

## RAPD e análise dos dados

O polimorfismo molecular foi avaliado com a técnica de RAPD-PCR. Nesta técnica foram utilizados 28 espécimes de *B. orbignyana* do rio Paraná e 26 de estoque de piscicultura.

As duas populações foram analisadas com os *primers* RAPD OPX03, OPX05, OPX07, OPX15, OPX18, OPW04, OPW09, OPW17 e OPW19 (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA). A mistura de reação de amplificação de cada um dos *primers* selecionados consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primer* 0,46 µM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reação de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), DNA (10 ng) e água suficiente para completar 13 µL. 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 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. Controles negativos, sem molde de DNA, foram incluídos em cada PCR.

Cerca de 10 µL dos produtos das amostras amplificadas foram fracionados em gel de agarose 1,4% e submetidos em uma cuba de eletroforese, com tampão TBE (Tris-Borato), a 5 V.cm<sup>-1</sup>, durante 4-5 horas. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL) para a identificação e comparação dos fragmentos amplificados. A visualização dos fragmentos produzidos foi feita sob luz ultravioleta e o gel foi fotografado para análise. O tamanho dos fragmentos pôde ser estimado através de comparação da distância dos fragmentos migrados com as bandas de um marcador padrão (*Ladder* 100 pb – Invitrogen).

Comparações entre os indivíduos foram feitas para avaliar a diversidade genética baseada na proporção de locos polimórficos dentro das populações. O índice de diversidade molecular baseado na média da diversidade de todos os locos haplotípicos, e o índice de fixação molecular  $F_{ST}$ , ambos baseados em dados RAPD, foram estimados com auxílio do programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). A significância do índice molecular  $F_{ST}$  foi determinada usando um procedimento de permutação não-paramétrico. A similaridade de Jaccard e a diferenciação genética entre as populações foram avaliadas com a aplicação do teste de Mantel para a matriz de similaridade de Jaccard, usando o software Mantel-Struct 1.0 (Miller, 1999). O gráfico de dispersão em coordenadas principais foi construído com os complementos aritméticos da similaridade de Jaccard após correção de Lingoies (Legendre & Anderson, 1999), utilizando o programa DistPCoA (Legendre & Anderson, 1998).

## **DNA mitocondrial e análise dos dados**

A região controle do genoma mitocondrial foi parcialmente amplificada por PCR a partir do DNA total de indivíduos de *B. orbignyanus* amostrados no rio Paraná e em estoque de piscicultura. A amplificação foi realizada a partir de cinco indivíduos de cada região, utilizando-se o par de *primers D-loop* L 5'-AGAGCGTCGGTCTTGTAACC-3' (Cronin *et al.*, 1993) e H16498 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (Meyer *et al.*, 1990). Para o seqüenciamento foram realizadas duas ampliações independentes. Além disso, foram seqüenciadas as duas fitas de cada produto de reação.

A mistura de reação de amplificação consistiu basicamente de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 2,5 μM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U/Reação de *Taq* DNA polimerase, DNA genômico 15 ng e água deionizada e autoclavada para completar 25 μL. O fragmento de DNA foi amplificado em 1 ciclo de 4 min a 94°C, 30 s a 56°C e 2 min a 72°C, 40 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 56°C e 2 min a 72°C, e um último ciclo de 15 s a 94°C, 30 s a 56°C e 10 min a 72°C. Amostras de DNA (cerca de 50 ng) amplificado em cada reação de PCR foram usadas diretamente em reações de seqüenciamento com *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing*, em um seqüenciador automático ABI-3100 (Perkin Elmer), de acordo com instruções do fabricante.

As seqüências nucleotídicas foram alinhadas e analisadas no programa Vector NTI Suite versão 6.0 (Informax, Inc.). Todas as seqüências de DNAm foram alinhadas com o programa CLUSTALW. Análises genéticas das seqüências mitocondriais foram realizadas com o programa MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2004). Foram determinadas as distâncias genéticas de Tamura e Nei entre os indivíduos. A matriz de distâncias foi utilizada para construir um dendrograma com o algoritmo *neighbor-joining*, com análises de *bootstrap* baseadas em 10.000 reamostragens.

## RESULTADOS

### RAPD

Foram analisados 28 indivíduos do rio Paraná e 26 de estoque de piscicultura. Os nove *primers* selecionados produziram 82 locos RAPD com expressão consistente. O número de bandas nítidas e reproduzíveis geradas por *primer* variou de seis a dez. Considerando-se as duas populações simultaneamente, foram encontrados 38 locos monomórficos, ou seja, o alelo dominante está presente em todos os indivíduos analisados das duas populações. Quando analisados dentro de cada população, não houve locos monomórficos exclusivos. A população do rio Paraná apresentou 28 locos polimórficos (34,15%), sendo seis exclusivos, enquanto a proveniente de piscicultura apresentou apenas 12 (14,63%) e ausência de locos exclusivos. A Fig. 3, com perfil eletroforético obtido com *primer* OPX07, mostra maior polimorfismo existente na população do rio Paraná. As estimativas do índice de

fixação molecular  $F_{ST}$  (0,2026;  $p= 0,000$ ) e teste de Mantel (0,3970;  $p= 0,0001$ ) demonstraram diferenciação genética entre as duas populações, embora pouco acentuada. A análise em coordenadas principais (Fig. 4) e o agrupamento *neighbor-joining* (Fig. 5), utilizando similaridade de Jaccard entre indivíduos mostraram separação das duas populações. O valor do índice de diversidade molecular foi maior para a população do rio Paraná ( $IM = 0,2691$ ), indicando que a mesma é geneticamente mais variável que a população de piscicultura ( $IM = 0,1196$ ). Há, portanto, concordância entre as análises obtidas pelos marcadores moleculares RAPD.

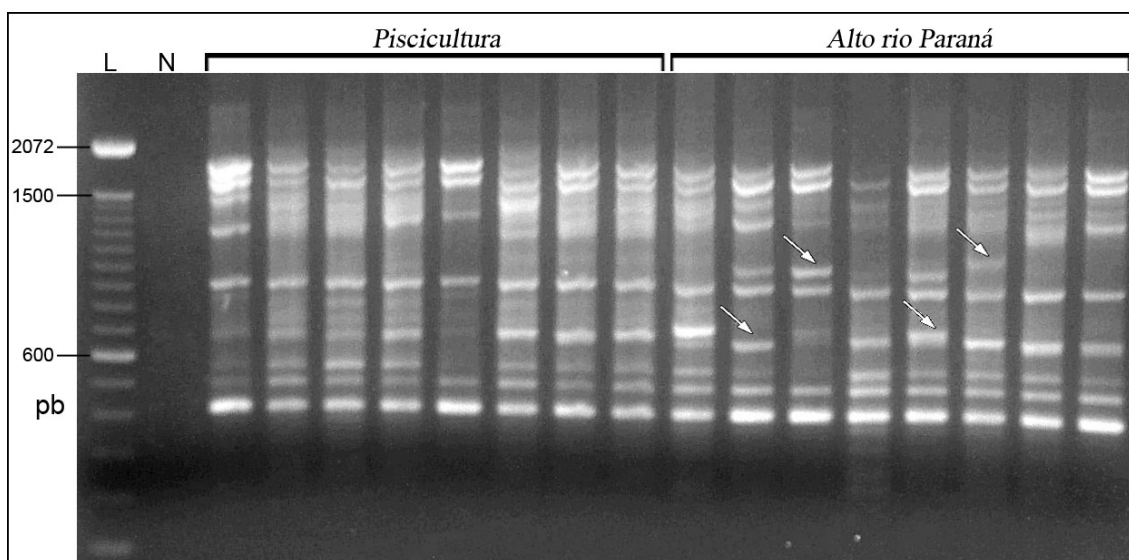
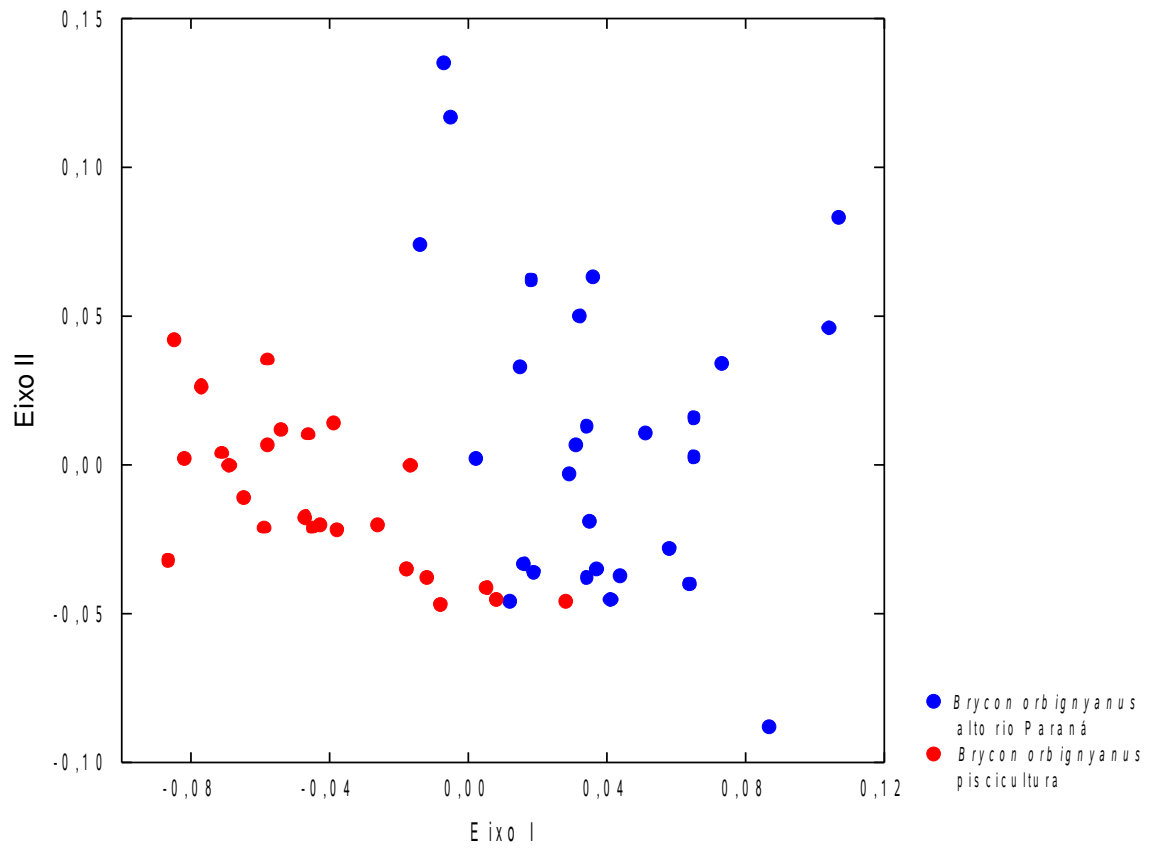
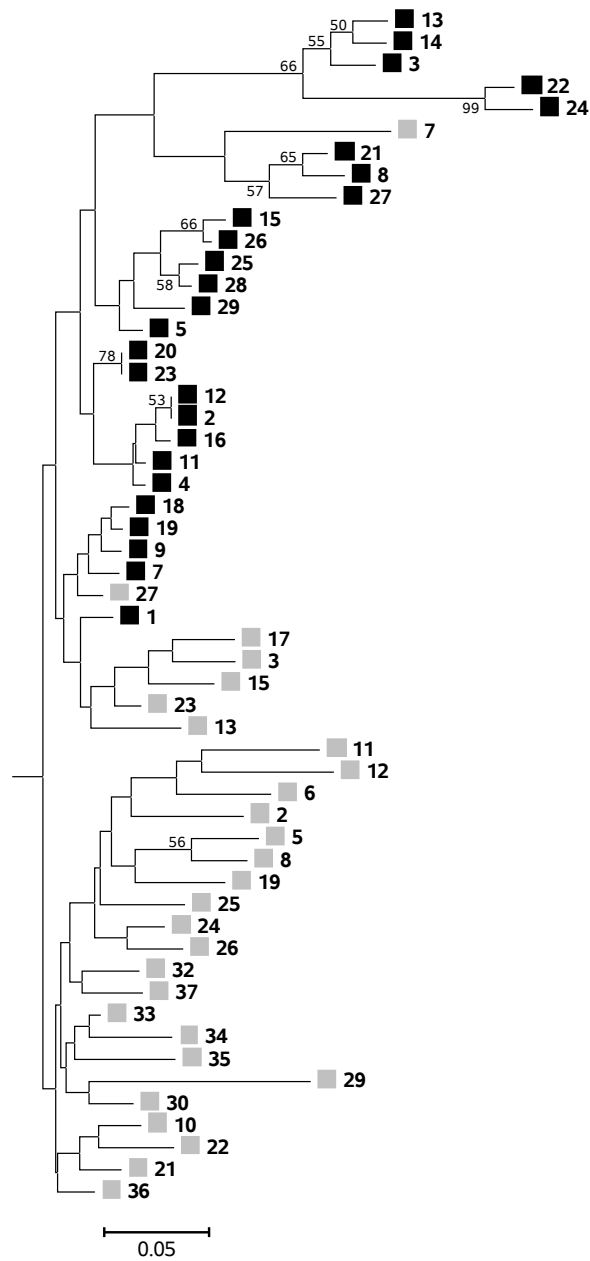


Figura 1:

**Figura 3.** Perfil eletroforético obtido com *primer* OPX07 de populações de *Brycon orbignyanus* provenientes de estoque de piscicultura e do alto rio Paraná. **L:** contém os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* 100 pb, Invitrogen); **N:** controle negativo, sem DNA. Setas indicam polimorfismo.



**Figura 4.** Gráfico de dispersão em coordenadas principais construído com os complementos aritméticos da similaridade de Jaccard entre indivíduos de *Brycon orbignyanus* de populações de piscicultura e do alto rio Paraná.



■ *Brycon orbignyana* de piscicultura

■ *Brycon orbignyana* do alto rio Paraná

**Figura 5.** Dendrograma *neighbor-joining* construído com os complementos aritméticos da similaridade de Jaccard entre espécimes de *Brycon orbignyana* de populações de piscicultura e do alto rio Paraná.



## DNA mitocondrial

Um fragmento de aproximadamente 540 pb, correspondente à região variável do *D-loop* do DNAm<sub>t</sub>, foi seqüenciado e utilizado para análise (Fig. 6). Foram identificados polimorfismos entre as populações de ambiente natural e de estoque de piscicultura. A população do rio Paraná apresentou 19 sítios polimórficos exclusivos, além de quatro deleções exclusivas. As substituições consistiram em sua maioria de transições. Além disso, foi detectada maior variabilidade nucleotídica dentro da população do rio Paraná. O dendrograma *neighbor-joining* (Fig. 7) construído a partir das distâncias de Tamura e Nei, ilustra a diferenciação genética entre a população do alto rio Paraná e a população de piscicultura. Os espécimes de piscicultura compartilham um único grupo, geneticamente similar. Apenas um espécime de *B. orbignyana* do alto rio Paraná agrupou-se com espécimes de piscicultura. Para os outros espécimes foram identificados cinco haplótipos diferentes, sendo um deles mais próximo geneticamente da população de piscicultura.

```

B-orb-AP24      1 GGAGATCGGAGGTTAGAATCCTCCCTAGCGCCCAGGAAAAAGAGACTTTAACTCCTATCA
B-orb-AP2      1 .....
B-orb-Ps12     1 .....
B-orb-Ps11     1 .....
B-orb-Ps9      1 .....
B-orb-Ps7      1 .....
B-orb-Ps4      1 .....
B-orb-AP3      1 .....
B-orb-AP22     1 .....
B-orb-AP10     1 .....T.....
B-orb-AP8      1 .....
consensus      1 *****

B-orb-AP24     61 CTAACTCCCAAAGCTAGCATTCTTAACTATCTCCTGTATCACATAATGATAGTACT
B-orb-AP2      61 .....
B-orb-Ps12     61 .....G.....
B-orb-Ps11     61 .....G.....
B-orb-Ps9      61 .....G.....
B-orb-Ps7      61 .....G.....
B-orb-Ps4      61 .....G.....
B-orb-AP3      61 .....G.....
B-orb-AP22     61 .....T.....--G..G.....
B-orb-AP10     61 .....T.....G..G.....
B-orb-AP8      61 .....T.....G..G.....
consensus      61 *****

B-orb-AP24     121 AATTTTCTCAACTTAGTTTCTTGATGTACTACTCCACTATTTGTGTACTAGTACATACA
B-orb-AP2      121 .....
B-orb-Ps12     121 .....
B-orb-Ps11     121 .....
B-orb-Ps9      121 .....

```

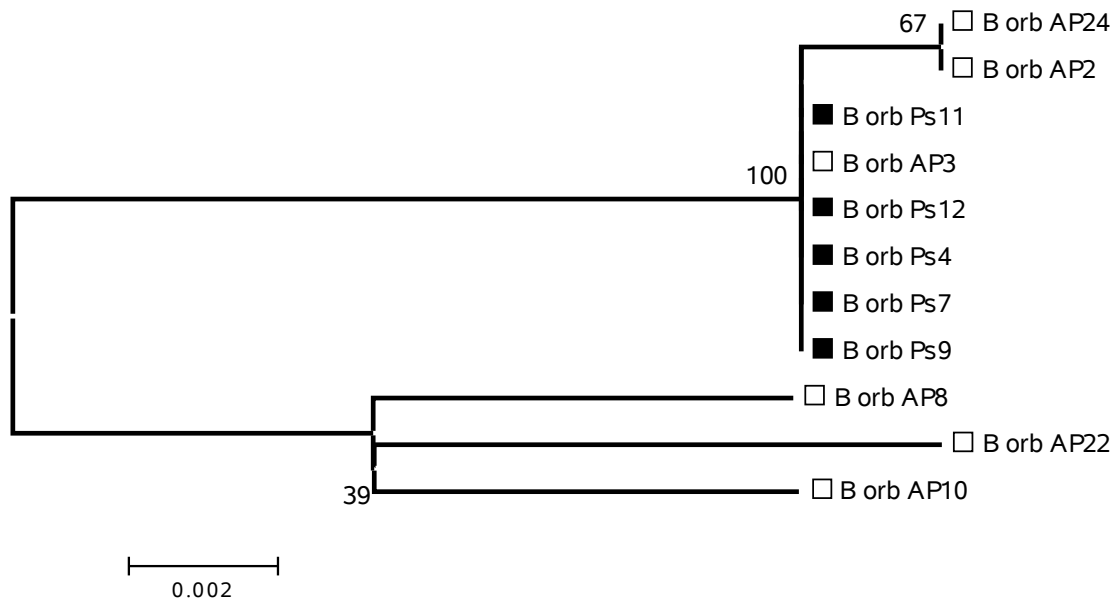
B-orb-Ps7	121	.....
B-orb-Ps4	121	.....
B-orb-AP3	121	.....
B-orb-AP22	119	G.....-
B-orb-AP10	121	.....-
B-orb-AP8	121	.....-
consensus	121	.*****.*****
B-orb-AP24	181	TATGGTTTAAATACATATATGTATTATTCCTACTATACATGGTTTAAATACATACATATGG
B-orb-AP2	181	.....
B-orb-Ps12	181	.....
B-orb-Ps11	181	.....
B-orb-Ps9	181	.....
B-orb-Ps7	181	.....
B-orb-Ps4	181	.....
B-orb-AP3	181	.....
B-orb-AP22	178	.....T.....
B-orb-AP10	180	.....
B-orb-AP8	180	.....
consensus	181	.*****.*****
B-orb-AP24	241	TTTAGTACATACATATGGTTTAAATACATATATATGTATTATTTTACATGTGCTTGTA
B-orb-AP2	241	.....
B-orb-Ps12	241	.....
B-orb-Ps11	241	.....
B-orb-Ps9	241	.....
B-orb-Ps7	241	.....
B-orb-Ps4	241	.....
B-orb-AP3	241	.....
B-orb-AP22	238	.....
B-orb-AP10	240	.....
B-orb-AP8	240	.....C.....
consensus	241	.*****.*****
B-orb-AP24	301	CATTAAATCATTAAATAAACATTTCTATATCATAGAACAGTCATCCA-CACCATAACAAAG
B-orb-AP2	301	.....-.....
B-orb-Ps12	301	.....-
B-orb-Ps11	301	.....-
B-orb-Ps9	301	.....-
B-orb-Ps7	301	.....-
B-orb-Ps4	301	.....-
B-orb-AP3	301	.....-
B-orb-AP22	298	.....C.....T.A.T.....
B-orb-AP10	300	.....C.....T.A.....
B-orb-AP8	300	.....C.G.....T.A.....
consensus	301	.*****.*****.*****.*****
B-orb-AP24	360	AAGACTCAGATAAACCATTAATTAAGACCGAGAAATAATTTAATTTAACCTGATAACTT
B-orb-AP2	359	.....
B-orb-Ps12	360	.....
B-orb-Ps11	360	.....
B-orb-Ps9	360	.....
B-orb-Ps7	360	.....
B-orb-Ps4	360	.....
B-orb-AP3	360	.....
B-orb-AP22	358	.....A.....C.....
B-orb-AP10	360	.....A.....C.....
B-orb-AP8	360	.....A.....C.....
consensus	361	.*****.*****.*****
B-orb-AP24	420	GAATAATCCCATACTCCATCACAAATTTTCTATGCAAGGACTCAACTATAATTGGTA
B-orb-AP2	419	.....
B-orb-Ps12	420	.....
B-orb-Ps11	420	.....
B-orb-Ps9	420	.....
B-orb-Ps7	420	.....
B-orb-Ps4	420	.....
B-orb-AP3	420	.....

```

B-orb-AP22 418 .....C.....T.....
B-orb-AP10 420 .....C.....CC.....
.....
B-orb-AP8 420 .....C.....
consensus 421 *****.*****.***.*****
B-orb-AP24 480 CTCA-TATATTAATGTAGTAAGAGACCACCAACCAGTATAAATAAAGGTACATTCTGCTT
B-orb-AP2 479 ....-.....
B-orb-Ps12 480 ....A.....
B-orb-Ps11 480 ....A.....
B-orb-Ps9 480 ....A.....
B-orb-Ps7 480 ....A.....
B-orb-Ps4 480 ....A.....
B-orb-AP3 480 ....-.....
B-orb-AP22 478 ....-.....C.....
B-orb-AP10 480 ....-.....C.....
B-orb-AP8 480 ....-.....C.....
consensus 481 ****.*****.*****.*****
B-orb-AP24 539 GAA
B-orb-AP2 538 ...
B-orb-Ps12 540 ...
B-orb-Ps11 540 ...
B-orb-Ps9 540 ...
B-orb-Ps7 540 ...
B-orb-Ps4 540 ...
B-orb-AP3 539 ...
B-orb-AP22 537 ...
B-orb-AP10 539 ...
B-orb-AP8 539 ...
consensus 541 ***

```

**Figura 6.** Alinhamento múltiplo em ClustalW de seqüências nucleotídicas da região hipervariável do *D-loop* de espécimes de *B. orbignyana* da planície alagável do alto rio Paraná (B-orb-AP), e de estoque de piscicultura (B-orb-Ps).



**Figura 7.** Dendrograma *neighbor-joining* obtido com a matriz de distâncias Tamura e Nei estimadas com as seqüências *D-loop* de espécimes de *B. orbignyanus* de populações de piscicultura (■) e do alto rio Paraná (□).

## DISCUSSÃO

As análises intra e interpopulacionais realizadas através dos dados gerados pela técnica RAPD demonstraram que a população de *B. orbignyanus* do rio Paraná apresenta maior polimorfismo genético que a população de piscicultura. De acordo com Wright (1978), valores de  $F_{ST}$  entre 0,15 e 0,25 indicam alta diferenciação genética, já valores maiores que 0,25 indicam que a população está muito diferenciada geneticamente. O valor de  $F_{ST}$  obtido entre as duas populações (0,2026) indica que há diferenciação genética entre elas. Estes resultados foram corroborados pela análise da região *D-loop* do DNAm.

A ocorrência de maior polimorfismo genético em populações naturais é esperada, já que normalmente os cruzamentos se dão ao acaso e a possibilidade de consangüinidade é menor. No entanto, alguns fatores podem levar a um declínio da diversidade genética. Entre eles, incluem-se a deterioração dos ambientes aquáticos por poluição, assoreamento e barramento de rios, pesca predatória e introdução de espécies exóticas (Bruton, 1995). Além disso, a captura intensiva de populações naturais ou estabelecimento em larga escala de populações produzidas em centrais de

produção de alevinos por muitas gerações pode alterar a estrutura genética da espécie. Para que esta alteração não ocorra ou seja minimizada, é importante que os reprodutores utilizados nos cruzamentos para produção de alevinos, com finalidade de repovoamento, sejam representantes da variabilidade genética presente no ambiente natural. Wasko *et al.* (2004), estudando *Brycon cephalus*, propõem algumas estratégias para manter em longo prazo as gerações de cultivo sem que haja perda significativa da variabilidade genética. Os autores sugerem a genotipagem dos reprodutores potenciais antes do estabelecimento dos próximos estoques de cultivo, ou o cruzamento dos estoques com populações de peixes selvagens.

A população de piscicultura analisada neste trabalho possui alto grau de similaridade genética. Este fato pode estar relacionado a fatores tais como o uso de poucos peixes reprodutores, o emprego de estratégias de reprodução inapropriadas, deriva genética e cruzamentos consangüíneos (Wasko *et al.*, 2004). O aumento da endogamia pode levar a um aumento da homozigose, possibilitando que alelos deletérios raros e detrimenais tenham maior chance de se expressarem, o que afeta o crescimento, o desempenho reprodutivo, o aumento de anormalidades e de mortalidade (Hansson & Westerberg, 2002; Povh *et al.*, 2005). A população de piscicultura estudada é fruto de gerações obtidas através do cruzamento com reprodutores capturados rio Baía. Sendo assim, uma outra hipótese para explicar sua baixa variabilidade genética é que a população do rio Baía pode ser geneticamente menos variável que a população do rio Paraná. Entretanto, o mais provável é que o número de matrizes utilizado não foi grande o suficiente para representar a variabilidade genética da população original.

A planície de inundação do alto rio Paraná, nos últimos anos, tem sido caracterizada pela ausência de grandes cheias. Uma das conseqüências desta ausência de inundação é a diminuição do recrutamento de espécies, como *B. orbignyanus*, que utiliza as áreas inundadas para desova e alimentação. Este fato agrava ainda mais a sobrevivência da espécie. Considerando que *B. orbignyanus* está seriamente ameaçada de extinção, o monitoramento genético de suas populações naturais torna-se de fundamental importância para a conservação da espécie. Populações naturais podem encontrar-se geneticamente estruturadas, ou seja, constituem sub-populações com composição genética definida, e que estão adaptadas e equilibradas a

determinadas condições ambientais (Foresti *et al.*, 1992). Estas subpopulações constituem estoques, cuja variabilidade genética deve ser identificada e considerada em programas de conservação de espécies ameaçadas, como *B. orbignyanus*. Através do estudo de suas populações naturais, podem ser selecionados indivíduos com variado grau de diversidade, que seriam utilizados como reprodutores em programas de repovoamento da espécie, introduzindo as gerações obtidas em locais onde ela se encontra ameaçada ou extinta. Neste caso, para que o novo estabelecimento seja bem sucedido, a diversidade genética das populações naturais deve ser mantida nas populações produzidas em estações de piscicultura. Nos locais onde a pressão de pesca é maior, este procedimento se torna ainda mais relevante, pois através do uso de um número adequado de matrizes, os indivíduos capturados podem ser repostos no ambiente pelas gerações obtidas em instalações de piscicultura, sem perda da sua diversidade genética.

Alguns estudos com espécies do gênero *Brycon* têm sido realizados com objetivos de conservação, como para *Brycon cephalus* (Wasko *et al.*, 2004), *Brycon lundii* (Wasko & Galetti Jr., 2002) e *Brycon opalinus* (Hilsdorf *et al.*, 2002; Barroso *et al.*, 2003; Barroso *et al.*, 2005). No entanto, poucos estudos de *B. orbignyanus* com marcadores moleculares são encontrados na literatura, os quais são em conjunto com outras espécies do mesmo gênero (Wasko *et al.*, 2001; Wasko & Galetti Jr., 2003). Acredita-se que o principal fator para esta limitação é a dificuldade em coletar exemplares da espécie, que em muitos locais onde era freqüente, agora é rara ou ausente. Estudos com microsatélites (Barroso *et al.*, 2003; Barroso *et al.*, 2005), minissatélites (Wasko & Galetti Jr., 2003), região espaçadora do DNAr 5S (NTS) e DNAm<sub>t</sub> (Hilsdorf *et al.*, 2002) têm sido úteis em identificar espécies do gênero *Brycon* e acessar variabilidade genética entre populações. No entanto, o emprego destas técnicas possui custo elevado e pode ser mais demorado, quando for necessário o seqüenciamento, como é o caso do DNAm<sub>t</sub>, podendo ser também aplicado aos NTSs. Por outro lado, a técnica RAPD, utilizada neste trabalho, é mais rápida e tem menor custo, tendo se mostrado como ferramenta eficaz em detectar polimorfismo genético em populações naturais (Wasko & Galetti Jr., 2002, Panarari, 2003; Sofia *et al.*, 2006; Theodorakis *et al.*, 2006).

No presente trabalho apenas uma população de ambiente natural de *B. orbignyanus* foi utilizada, devido à sua escassez em vários sistemas aquáticos

onde era originalmente encontrada. Apesar disto, foi possível detectar variabilidade genética, bem como comparar com uma população de piscicultura, a qual apresentou baixo polimorfismo. Os marcadores utilizados se mostraram eficazes em demonstrar a variabilidade genética, e, portanto, seu uso é recomendado na identificação de estoques naturais. Como *B. orbignyana* está seriamente ameaçada de extinção, os dados obtidos podem subsidiar a formulação de estratégias de manejo e conservação da diversidade genética da espécie. Para isto, sugere-se que novos esforços sejam realizados, no sentido de amostrar um maior número de locais, para que vários espécimes possam ser selecionados como reprodutores, no sentido de evitar ou minimizar as perdas genéticas por cruzamentos consangüíneos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho, A.A., Júlio, Jr H.F. & Petrere, Jr M. (1994): Itaipu reservoir (Brazil): impacts of the impoundment on the fish fauna and fisheries. In *Rehabilitation of freshwater fisheries*. (Cowx I.G., ed.), pp. 171-184. London: Fishing News Books/Blackwell Scientific Publ. Ltd.

Agostinho, A.A., Julio, Jr. H.F., Gomes, L.C., Bini, L.M. & Agostinho, C.S. (1997): Composição; abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In *A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná: Aspectos Físicos; Biológicos e Sócio-Econômicos*. (Vazzoler A.E.A.M., Agostinho A.A. & Hahn. N.S., ed.), pp. 178-208. Maringá: EDUEM.

Agostinho A.A. & Júlio Jr. H.F. (1999): Peixes da Bacia do Alto Paraná. In *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. (Lowe-McConnell R.H., ed.), pp. 374-400. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Barroso, R.M., Hilsdorf, A. W.S., Moreira, H.L.M., Mello, A.M., Guimarães, E.F., Cabello, P.H. & Traub-Cseko, Y.M. (2003). Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Molecular Ecology Notes* **3**, 297-298.

Barroso, R.M., Hilsdorf, A. W.S., Moreira, H.L.M., Cabello, P.H. & Traub-Cseko, Y.M. (2005). Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture* **247**, 51-65.

Borba, M.R., Fracalossi, D.M., Pezzato, L.E., Menoyo, D. & Bautista, J.M. (2003). Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. *Aquatic Living Resources* **16**, 362-369.

Bruton, M.N. (1995). Have fishes had their chips? The dilemma of threatened fishes. *Environmental Biology of Fishes* **43**, 1-27.

Cronin, M.A., Spearman, W.J., Wilmot, R.L., Patton, J.C. & Bickham, J.W. (1993). Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of Polymerase Chain Reaction (PCR) products. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**, 708-715.

Excoffier, L., Laval G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.

Foresti, F., Toledo-Filho, S.A & Almeida-Toledo, L.F. (1992). Manejo de recursos genéticos em populações de peixes. In *Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil* (Agostinho A.A. & Benedito-Cecílio E., ed.), pp. 58-68. Maringá: Editora da UEM.

Godoy, M.P. (1975). *Peixes do Brasil. Subordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi Guassu. Vol. II.* Piracicaba: Franciscana. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em : 27 oct. 2006.

Graça, W.J. & Pavanelli, C.S. (2006). *Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes.* Maringá: EDUEM. (no prelo).

Hansson, B. & Westerberg, L. (2002). On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology* **11**, 2467-2474.

Hilsdorf, A.W.S., Azeredo—Espin, A.M.L., Krieger, M.H. & Krieger, J.E. (2002). Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin Brazil. *Aquaculture* **214**, 81-91.

Hunnicut, D.W., Cingolani, J. & Voss, M.A. (2005) Use of mtDNA to identify genetic introgression among related species of catfish. *Journal of Great Lakes Research* **31** (4), 482-491.



- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150-163.
- Lage, C. & Kornfield, I. (2006). Reduced genetic diversity and effective population size in an endangered Atlantic salmon (*Salmo salar*) population from Maine, USA. *Conservation genetics* **7** (1) : 91-104.
- Legendre, P. & Anderson, M.J. (1998). Program DistPCoA. Département de sciences biologiques, Université de Montréal.
- Legendre, P. & Anderson, M. J. (1999). Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* **69**, 1-24.
- Lima, F.C.T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). (2003). In: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. (Reis R.E., Kullander S.O. & Ferraris Jr. C.J., ed.), pp. 174-181. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Liu, H.Z., Zhu, Y.R., Wang, J.W. & Tan, D.Q. (2005). Population genetic structure of an endemic cyprinid fish, *Ancherythroculter migrocauda*, in the upper reaches of the Yangtze River and its implication for conservation. *Korean Journal of Genetics* **27** (4) : 361-367.
- Machado, A.B.M. (2005). *Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados* (Machado A.B.M., Martins, C.S & Drummond, G.M., ed.). 160p. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.
- Meyer, A., Kocher, T.D., Basasibwaki P. & Wilson, A.C. (1990). Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* **347** (6293): 550-553.
- Miller, M.P. (1999). Mantel-Struct 1.0. A program for the detection of population structure through the use of Mantel tests. Northern Arizona University.
- Monesi, N., Jacobs-Lorena, M. & Paço-Larson, M.L. (1998). The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **107** (8), 559-569.

Panarari, R.S. (2003). Variabilidade e estrutura genética de populações de *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes, Sciaenidae) da bacia do rio Paraná. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Pr, Brasil.

Povh, J.A., Moreira, H.L.M., Ribeiro, R.P., Prioli, A. J., Vargas, L., Blanck, D.V., Gasparino E. & Streit Jr, D. P. (2005). Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica RAPD. *Acta Scientiarum* **27** (1), 1-10.

Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J., Julio Jr, H.F., Pavanelli, C.S., Oliveira, A.V., Carrer, H., Carraro, D.M. & Prioli, L.M. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* **25** (4), 421-430.

Saccone, C., Gissi, C., Reyes, A., Larizza, A., Sbisà, E. & Pesole, G., (2002). Mitochondrial DNA in Metazoa: degree of freedom in a frozen event. *Gene* **286**, 3-12.

Sirol, R.N. & Britto, S.G. (2005). Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata* (Nogueira M.G., Thomaz S.M., Henry R. & Jorcin A., ed.), pp. 275-284. São Carlos: RiMa.

Sivasundar, A., Bermingham, E & Orti, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* **10** (2), 407-17.

Sofia, S.H., Silva, C.R.M., Galindo, B.A., Almeida, F.S., Sodré, L.M.K., Martinez, C.B.R. (2006). Population genetic structure of *Astyanax scabripinis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia* **553**, 245-254.

Theodorakis, C.W., Lee, K.L., Adams, S.M. & Law, C.B. (2006). Evidence of altered gene flow, mutation rate, and genetic diversity in redbreast sunfish from a pulp-mill-contaminated river. *Environmental Science & Technology* **40** (1), 377-386.

Wasko, A.P., Martins, C., Wright, J.M. & Galetti Jr., PM. (2001). Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* **44**, 893-902.

Wasko, A.P. & Galetti Jr., PM. (2002). RAPD analysis in the neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia* **474**, 131-137.

Wasko, A.P. & Galetti Jr., PM. (2003). PCR primed with minisatellite core sequences yields species-specific patterns and assessment of population variability in fishes of the genus *Brycon*. *J. Appl. Ichthyol.* **19**, 109-113.

Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C., Senhorini, J.A. & Foresti, F. (2004). Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *J. Appl. Ichthyol.* **20**, 48-52.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.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.

Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations: Variability within and among natural populations*. Vol. 4. Chicago: University of Chicago Press.

## CAPÍTULO 2

### REGISTRO DE *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Characidae) NO RESERVATÓRIO DE ITAIPU, COM IDENTIFICAÇÃO POR RAPD E SEQÜÊNCIAS *D-LOOP* DO DNA MITOCONDRIAL.

#### RESUMO

O gênero *Brycon* compreende um grupo de peixes neotropicais migratórios, de grande importância na atividade pesqueira. Em análises preliminares, amostras de tecido muscular e nadadeiras, sem os indivíduos inteiros, de *Brycon* foram obtidas de pescadores profissionais no reservatório de Itaipu. Marcadores RAPD revelaram divergência entre os indivíduos do reservatório e espécimes de *Brycon orbignyanus* do trecho lótico do rio Paraná, indicando a presença de duas espécies de *Brycon* na bacia do alto rio Paraná. *Brycon orbignyanus*, conhecida como piracanjuba, é a única espécie nativa do alto rio Paraná. No médio rio Paraná, além de *B. orbignyanus*, ocorre *B. hilarii*, conhecida como piraputanga. Na bacia do alto rio Paraguai apenas *B. hilarii* é encontrada. Este trabalho teve como objetivo verificar a hipótese da presença de *B. hilarii* no reservatório de Itaipu, pela avaliação com marcadores RAPD e diversidade da região *D-loop* do DNA mitocondrial. Coletas de *B. hilarii* foram realizadas no rio Paraguai, em Corumbá (MS) e no rio Manso (MT), na bacia do alto rio Paraguai para comparar com a população de *Brycon* do reservatório de Itaipu. Os perfis eletroforéticos obtidos pela técnica RAPD e haplótipos das seqüências *D-loop* do DNAm<sub>t</sub> mostraram que os espécimes coletados no reservatório de Itaipu são geneticamente similares aos espécimes de *B. hilarii* do rio Manso e do rio Paraguai. Por outro lado, distinguem-se totalmente dos espécimes de *B. orbignyanus*. Portanto, os resultados confirmam a presença de *B. hilarii* no reservatório de Itaipu. Há relatos de que esta introdução tenha sido feita no lado paraguaio do rio Paraná. No entanto, ela pode ter sido isolada, pois, de acordo com pesquisadores da Engenharia de Pesca da UNIOESTE, não tem sido registrada a presença de *B. hilarii* no canal de Itaipu, onde estudos periódicos têm sido realizados. Estudos adicionais devem ser conduzidos para verificar se *B. hilarii* tem se estabelecido na bacia do rio

Paraná, pois não se sabe que riscos esta introdução pode trazer para a ictiofauna local.

## ABSTRACT

The genus *Brycon* comprises a group of migratory neotropical fish of great importance in fishery. Samples of muscle tissues and fins of *Brycon*, lacking the entire body, were obtained from professional fishermen in the Itaipu Reservoir for preliminary analyses. Since RAPD markers showed divergences between specimens from the reservoir and *Brycon orbignyanus* specimens from the lotic stretch of the Paraná River, the presence of two species of *Brycon* in the upper river Paraná basin was confirmed. *Brycon orbignyanus*, popularly known as piracanjuba, is the only native species of the upper Paraná River. Besides *B. orbignyanus*, *B. hilarii*, known as piraputanga, inhabits the middle Paraná River, whereas only *B. hilarii* is found in the upper Paraguay River basin. Current research aims to verify the presence of *B. hilarii* in the Itaipu Reservoir by RAPD markers and by D-loop region diversity of mitochondrial DNA. Specimens of *B. hilarii* were collected from the Paraguay River, in Corumbá MS Brazil and in the Manso River, in the upper Paraguay River basin, and compared with the *Brycon* population of the Itaipu reservoir. RAPD technique electrophoresis and haplotypes of mtDNA D-loop sequences showed that specimens from the Itaipu Reservoir are genetically similar to *B. hilarii* specimens from the rivers Manso and Paraguay. On the other hand, they are completely distinguished from *B. orbignyanus* specimens. Results confirm the presence of *B. hilarii* in the Itaipu Reservoir. Although it has been reported that introduction of the species has occurred from the Paraguayan margin of the Paraná River, it may have occurred eventually. Researchers in Fishery Engineering from UNIOESTE state that *B. hilarii* had not been reported in the Itaipu canal where studies have been periodically undertaken. Due to the unknown risks that its introduction may cause to local ichthyofauna, other researches must be undertaken to verify whether *B. hilarii* has established itself in the Paraná River basin.

## INTRODUÇÃO

A introdução de espécies de peixes exóticas nos ambientes aquáticos tem sido bastante relatada nos últimos anos (Rosecchi *et al.*, 1993; Golani, 2000; Stepien *et al.*, 2005; Kawamura *et al.*, 2006). Em todos os ambientes aquáticos a presença de espécies de peixes invasoras pode gerar vários impactos sobre a ictiofauna local, com conseqüências negativas para a biodiversidade (Sakai *et al.*, 2001).

As espécies introduzidas podem afetar a fauna local de várias maneiras, levando a um desequilíbrio do ecossistema. A introdução de parasitas através de espécies de peixes não nativas, por exemplo, pode causar doenças e mortalidade nas espécies nativas (Amin & Minckley, 1996; Vincent & Font, 2003; Galli *et al.*, 2005). Em adição aos peixes, outras comunidades podem ser impactadas pela introdução de espécies exóticas. O aumento de nutrientes no ambiente liberados por peixes exóticos, como a tilápia, pode afetar a comunidade fitoplanctônica (Figueredo & Giani, 2005). A predação em alguns casos pode levar a uma redução de populações de anfíbios (Bosch *et al.*, 2006; Orizaola & Brana; 2006), e mudanças na cadeia alimentar causadas por espécies introduzidas podem gerar efeitos em cascata, afetando várias comunidades, como o zooplâncton e pássaros (Ortubay *et al.*; 2006). Além disso, competições podem existir em relação à obtenção de alimento, espaço e locais de desova.

As espécies exóticas podem ainda causar impactos genéticos. A hibridação entre organismos introduzidos e nativos, por exemplo, leva à perda de formas puras (biodiversidade), redução da eficiência de acasalamentos e baixo rendimento reprodutivo, entre outros efeitos, que podem variar de acordo com as características de cada população (Coates, 1998; Sakai *et al.*, 2001)

As bacias hidrográficas da região neotropical possuem a maior biodiversidade de peixes do mundo, com mais de 2.400 espécies já descritas (Lowe-McConnel, 1999). Além disso, foram as que receberam a maior quantidade de espécies exóticas. Neste aspecto, o Brasil é o país com o maior número de introduções (Agostinho & Júlio Jr, 1996).

A bacia do rio Paraná possui várias espécies introduzidas, principalmente devido à construção de diversos reservatórios ao longo de seu

trecho, que foram acompanhados pela instalação de estações de piscicultura. Esta introdução inclui peixes de outras bacias, e ocorreu tanto por meio de programas de peixamento quanto por acidentes em tanques de piscicultura da região (Agostinho & Júlio Jr., 1999). O escape pela aqüicultura tem sido uma das principais causas da introdução de espécies de peixes exóticas (Sapota, 2004; de Jong *et al.*, 2004; Casal, 2006). Outras causas de introdução incluem a liberação de aquários (Ruiz-Carus *et al.*, 2006), a indústria de peixes ornamentais (Kerr *et al.*, 2005) e o controle biológico (Ling, 2004; Leyse *et al.*, 2004; Mitchell & Kelly, 2006).

O gênero *Brycon* compreende um grupo de peixes neotropicais migratórios, com ampla distribuição em sistemas aquáticos brasileiros. *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850) (Fig. 1), conhecida como piraputanga, é onívora e pertence à sub-família Bryconinae. Esta espécie é originalmente encontrada na bacia do rio Paraguai e no médio rio Paraná, onde alimenta-se de peixes, frutos e sementes. Vive em locais de corredeiras e nos remansos, embaixo de árvores frutíferas e próximas às plantas aquáticas. Juntamente com outras espécies do gênero *Brycon*, destaca-se por sua importância na atividade pesqueira, além de ser apreciada também na pesca esportiva.

Em análises preliminares, amostras de tecido muscular e nadadeiras, sem os indivíduos inteiros, de *Brycon* foram obtidas de pescadores profissionais no reservatório de Itaipu. Marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) revelaram divergência entre os indivíduos do reservatório e espécimes de *Brycon orbignyanus* do trecho lótico do rio Paraná, indicando a presença de duas espécies de *Brycon* na bacia do alto rio Paraná. Como *B. orbignyanus* é nativa do alto rio Paraná, é possível que a outra espécie seja *B. hilarii*, devido à comunicação do médio rio Paraná com o alto rio Paraná, após a construção da barragem de Itaipu. Outra possibilidade seria o escape ou a soltura de espécimes de *B. hilarii* a partir de estoques de piscicultura.

Análises morfológicas poderiam diferenciar as duas espécies, pela contagem do número de escamas presentes na linha lateral. *Brycon hilarii* possui de 65 a 82 escamas na linha lateral, enquanto *B. orbignyanus* possui de 52 a 63 (Graça & Pavanelli, 2006). No entanto, devido à ausência de indivíduos inteiros, foi realizada apenas a identificação molecular.

Os marcadores moleculares, como RAPD e DNA mitocondrial (DNAMt), são ferramentas úteis em vários estudos, relacionados com a variabilidade

genética de populações, filogenia, e identificação de espécies. A técnica RAPD se baseia na amplificação, via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), de fragmentos de DNA ao acaso, com o emprego de *primers* com seqüências nucleotídicas curtas e arbitrárias (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990). O DNA mitocondrial possui várias regiões que podem ser utilizadas como marcadores. A escolha da região mais adequada vai depender do objetivo do estudo, podendo ser mais ou menos conservada. A região controle do DNAm, também conhecida como *D-loop*, por possuir alta taxa de substituição nucleotídica, é adequada para estudos entre espécies próximas ou populações de uma mesma espécie. Sua aplicação tem sido ampla em populações de peixes (Davey *et al.*, 2003; Aboim *et al.*, 2005; Bremer *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005).

Este trabalho teve como objetivo verificar a hipótese da presença de *B. hilarii* no reservatório de Itaipu, pela avaliação com marcadores RAPD e diversidade da região *D-loop* do DNA mitocondrial.



**Figura 1.** *Brycon hilarii* proveniente do rio Manso (comprimento padrão 288,9 mm).

Fonte: Graça & Pavanelli, 2006.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Área de estudo**

#### Reservatório de Itaipu

O reservatório de Itaipu, formado a partir de novembro de 1982, possui área inundada de 1.460 km<sup>2</sup>. Parte desta área pertence ao Brasil (835 km<sup>2</sup>) e parte pertence ao Paraguai (625 km<sup>2</sup>). Está localizado no rio Paraná entre as cidades de Guaíra e de Foz do Iguaçu, no trecho fluvial entre a foz do rio Paranapanema e a do rio Iguaçu no Estado do Paraná. O reservatório de Itaipu corresponde ao trecho do médio rio Paraná que passou a ter continuidade com o alto rio Paraná depois da formação do lago.

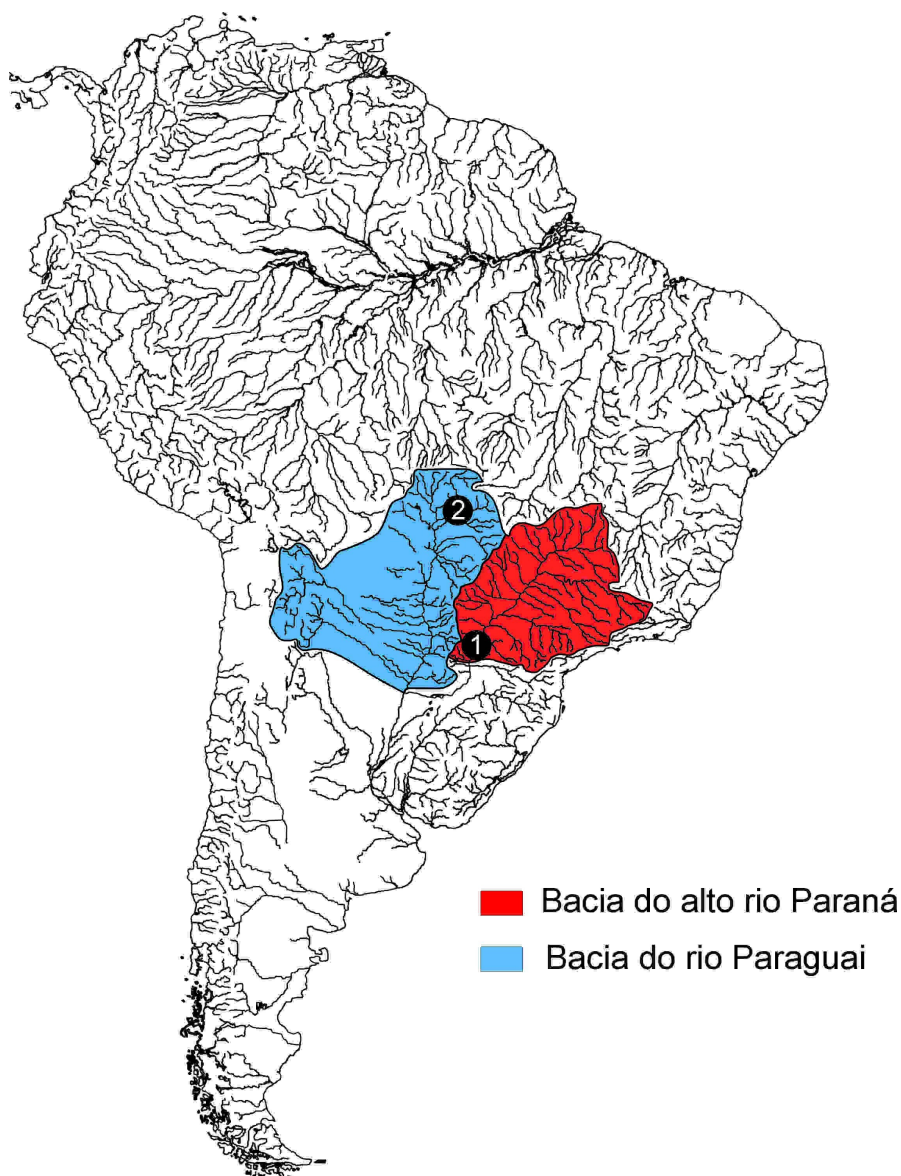
#### Bacia do rio Paraguai

O rio Paraguai nasce no Estado do Mato Grosso e desemboca ao sul no rio Paraná, após receber vários tributários, principalmente na margem esquerda. A oeste do Estado do Mato Grosso encontra-se a região do Pantanal, uma planície extensa de 180.000 km<sup>2</sup>, onde a precipitação média anual é de 1.100 mm.

### **Material biológico**

Os pontos de coletas de *Brycon* estão indicados na Fig. 2. Amostras de tecido muscular e nadadeiras de *Brycon* foram obtidas de pescadores profissionais da margem esquerda do reservatório de Itaipu, nas regiões de Pinho e Porto Mendes. Nessas coletas não foi possível preservar os exemplares inteiros. Coletas de *B. hilarii* foram realizadas no rio Paraguai, na região de Corumbá (MS), e rio Manso (MT), na bacia do alto rio Paraguai.

As amostras foram preservadas em frascos com álcool comercial, de modo que o volume de álcool fosse pelo menos três vezes o volume de tecido muscular. Depois de transferidos para o Laboratório de Genética do Departamento de Biologia Celular e Genética e do Nupélia, na Universidade Estadual de Maringá, os frascos foram estocados em freezer -20°C. Material testemunho de *B. hilarii* do rio Manso (Nup 3378) é encontrado na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura, da Universidade Estadual de Maringá.



**Figura 2.** Área de estudo localizada na bacia do rio Paraguai (1) e do alto rio Paraná (2).

### **Extração e quantificação do DNA genômico**

A extração de DNA foi efetivada com utilização da metodologia baseada em fenol/clorofórmio (Monesi *et al.*, 1998). Amostras de tecido muscular, com cerca de 100 mg foram maceradas em nitrogênio líquido. Ao extrato obtido adicionou-se tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Espermidina 0,15 mM), tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%) e proteinase K (20 µg/µL). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria com agitação, a

37°C por cerca de uma hora. Após, efetuou-se a purificação do DNA através de lavagens com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio. Na etapa seguinte, o DNA foi precipitado com solução salina (NaCl 0,2 M) e etanol gelado. Este precipitado foi submetido a várias centrifugações com etanol 70% e 100% e finalmente ressuspenso em TE (Tris 1 mM, EDTA 0,1 mM) contendo RNase. Posteriormente o DNA de todas as amostras foi quantificado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL). Essencialmente, a quantificação consistiu na comparação do DNA contido em 1 µL de cada amostra com quantidades conhecidas de DNA do fago λ (Invitrogen).

### **RAPD e análise de dados**

Foram obtidos marcadores moleculares RAPD a partir de amostras de DNA de 23 espécimes de *Brycon* do reservatório de Itaipu, 11 espécimes de *B. hilarii* do rio Manso e 24 de *B. orbignyanus* do alto rio Paraná. As três populações foram analisadas com o *primer* RAPD OPX05, (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA).

A mistura de reação de amplificação consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primer* 0,46 µM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reação de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), DNA (10 ng) e água suficiente para completar 13 µL. 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 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. Controle negativo, sem molde de DNA, foi incluído na PCR.

Cerca de 10 µL dos produtos das amostras amplificadas foram fracionados em gel de agarose 1,4% e submetido em uma cuba de eletroforese, com tampão TBE (Tris-Borato), a 5 V.cm<sup>-1</sup>, durante 4-5 horas. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL) para a identificação e comparação dos fragmentos amplificados. A visualização dos fragmentos produzidos foi feita sob luz ultravioleta e o gel foi fotografado para análise. O tamanho dos fragmentos pôde ser estimado através de comparação da distância dos fragmentos migrados com as bandas de um marcador padrão (*Ladder* 100 pb – Invitrogen). Pelo perfil eletroforético, comparações foram

feitas entre os indivíduos de *Brycon* do reservatório de Itaipu, *B. hilarii* do rio Manso e *B. orbignyianus* do alto rio Paraná, no sentido de verificar a hipótese da presença de *B. hilarii* no reservatório de Itaipu.

### **DNA mitocondrial e análise de dados**

A região controle do genoma mitocondrial, ou *D-loop*, foi parcialmente amplificada por PCR a partir do DNA total de oito espécimes de *Brycon* do reservatório de Itaipu, seis espécimes de *B. hilarii* provenientes do rio Paraguai e sete do rio Manso. A amplificação foi realizada utilizando-se o *primers D-loop* L 5'-AGAGCGTCGGTCTTGTAACC-3' (Cronin *et al.*, 1993) e o *primer* H16498 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (Meyer *et al.*, 1990). Para o seqüenciamento foram realizadas duas amplificações independentes. Além disso, foram seqüenciadas as duas fitas de cada produto de reação.

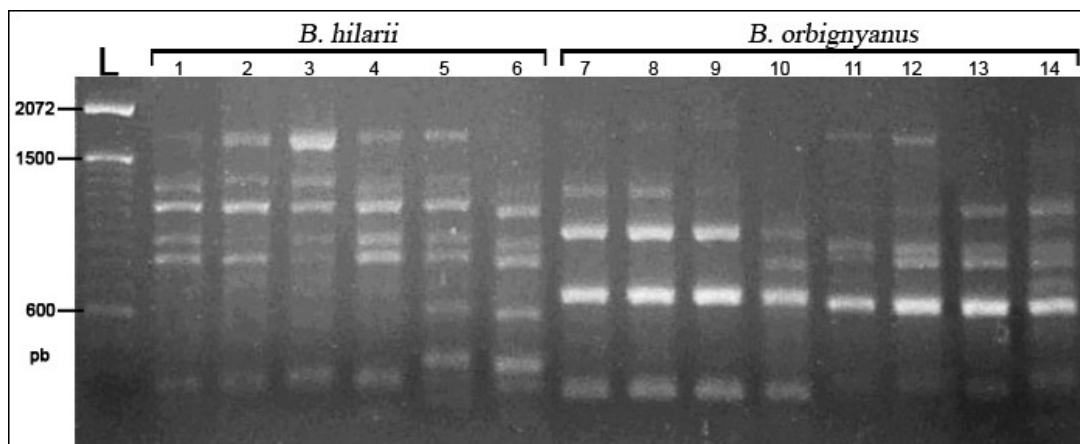
A mistura de reação de amplificação consistiu basicamente de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 2,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U/Reação de *Taq* DNA polimerase, DNA genômico 15 ng e água deionizada e autoclavada para completar 25 µL. O fragmento de DNA foi amplificado em 1 ciclo de 4 min a 94°C, 30 s a 56°C e 2 min a 72°C, 40 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 56°C e 2 min a 72°C, e um último ciclo de 15 s a 94°C, 30 s a 56°C e 10 min a 72°C. Amostras de DNA (cerca de 50 ng) amplificado em cada reação de PCR foram usadas diretamente em reações de seqüenciamento com *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing*, em um seqüenciador automático ABI-3100 (Perkin Elmer), de acordo com instruções do fabricante.

As seqüências nucleotídicas foram alinhadas e analisadas no programa Vector NTI Suite versão 6.0 (Informax, Inc.). Todas as seqüências de DNAm foram alinhadas com o programa CLUSTALW. Análises genéticas das seqüências mitocondriais foram realizadas com o programa MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2004). Foram determinadas as distâncias genéticas de Tamura e Nei entre os indivíduos. A matriz de distâncias foi utilizada para construir um dendrograma com o algoritmo *neighbor-joining*, com análises de *bootstrap* baseadas em 10.000 reamostragens. Além dos espécimes de *B. hilarii*, foram incluídas na análise espécimes de *B. orbignyianus*, como grupo controle.

## RESULTADOS

### RAPD

Os perfis eletroforéticos dos fragmentos obtidos pela amplificação RAPD, foram similares entre os espécimes de *Brycon* do reservatório de Itaipu e de *B. hilarii* do rio Manso. Por outro lado, espécimes de *B. orbignyanus* produziram padrões eletroforéticos totalmente distintos (Fig. 3). Apenas um *primer* foi utilizado, pois permitiu a distinção entre as duas espécies, demonstrando a presença de *B. hilarii* no reservatório de Itaipu.



**Figura 3.** Perfis eletroforéticos obtidos com *primer* RAPD OPX-05 de espécimes de *Brycon hilarii* do rio Manso (2), do reservatório de Itaipu (1; 3-6) e de *Brycon orbignyanus* (7-14). L: peso molecular (*Ladder* 100 pb, Invitrogen).

### DNA mitocondrial

Um fragmento de aproximadamente 520 pb, correspondente à região variável do *D-loop* do DNAm<sup>t</sup> foi seqüenciado e utilizado para análise (Fig. 4). Os espécimes de *B. hilarii* do rio Paraguai apresentaram duas substituições exclusivas, ausentes nos espécimes do reservatório de Itaipu e presentes em alguns do rio Manso. *Brycon orbignyanus* apresentou vários sítios polimórficos que a distinguiu de *B. hilarii*.

Além dos sítios polimórficos dispersos pelo segmento *D-loop*, um longo *indel* diferencia as duas espécies, com 73 pb presentes nos haplótipos de *B. orbignyanus* e ausentes nos haplótipos de *B. hilarii*. A diferença entre os

comprimentos dos haplótipos de *B. orbignyanus* e de *B. hilarii* pode ser detectada por eletroforese em gel de agarose (Fig. 5).

O dendrograma *neighbor-joining* (Fig. 6) obtido a partir das distâncias de Tamura e Nei agrupou os espécimes de *Brycon* do reservatório de Itaipu com os espécimes de *B. hilarii* do rio Manso e do rio Paraguai. *Brycon orbignyanus* formou um grupo totalmente separado.

```

BHi-It6      1 GGAGATCGGAGGTTAAAAATCCTCCCTAGCGCCCAGAAAAAGGAGACTTAAACTCCCATCA
BHi-It9      1 .....
BHi-It5      1 .....
BHi-It11     1 .....
BHi-It7      1 .....
BHi-It12     1 .....
BHi-It8      1 .....
BHi-It24     1 .....
BHi-RM6      1 .....
BHi-RM2      1 .....
BHi-MT15     1 .....
BHi-RM1      1 .....
BHi-MT17     1 .....
BHi-MT20     1 .....
BHi-MT19     1 .....
BHi-MT16     1 .....
BHi-MT23     1 .....
BHi-RM3      1 .....
BHi-RM21     1 .....
BHi-RM10A    1 .....
BHi-RM7      1 .....
PRJ-AP3      1 .....G.....G...A.....T.....T....
PRJ-AP2      1 .....G.....G...A.....T.....T....
PRJ-AP24     1 .....G.....G...A.....T.....T....
PRJ-AP22     1 .....G.....G...A.....T.....T....
PRJ-AP8      1 .....G.....G...A.....T.....T....
PRJ-AP10     1 .....G.....T...G...A.....T.....T....
consensus    1 *****.*****.****.****.*****.*****.****

```

```

BHi-It6      61 CTAGCTCCCAAAGCTAGTATTTTATTAAACTATTTCTGTTTCCACACATAATGAATTA
BHi-It9      61 .....
BHi-It5      61 .....
BHi-It11     61 .....
BHi-It7      61 .....
BHi-It12     61 .....
BHi-It8      61 .....
BHi-It24     61 .....
BHi-RM6      61 .....
BHi-RM2      61 .....
BHi-MT15     61 .....
BHi-RM1      61 .....
BHi-MT17     61 .....
BHi-MT20     61 .....
BHi-MT19     61 .....
BHi-MT16     61 .....
BHi-MT23     61 .....
BHi-RM3      61 .....
BHi-RM21     61 .....
BHi-RM10A    61 .....
BHi-RM7      61 .....
PRJ-AP3      61 ...A.....C.....C.....C.....A.---.....G--

```

PRJ-AP2 61 ...A.....C.....C.....C.....A.---.....--..  
 PRJ-AP24 61 ...A.....C.....C.....C.....A.---.....--..  
 PRJ-AP22 61 ...A.....C.....C.....A.---.....-G..G--..  
 PRJ-AP8 61 ...A.....C.....C.....A.---.....G..G--..  
 PRJ-AP10 61 ...A.....C.....C.....A.---.....G..G--..  
 consensus 61 \*\*\*,\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*

BHi-It6 121 GTACTAATTCACCTCACCTTGGTTGCTTGCTATGTACTACTCCACTATTTGTGTA-----  
 BHi-It9 121 .....-----  
 BHi-It5 121 .....-----  
 BHi-It11 121 .....-----  
 BHi-It7 121 .....-----  
 BHi-It12 121 .....-----  
 BHi-It8 121 .....-----  
 BHi-It24 121 .....-----  
 BHi-RM6 121 .....-----  
 BHi-RM2 121 .....-----  
 BHi-MT15 121 .....-----  
 BHi-RM1 121 .....-----  
 BHi-MT17 121 .....-----  
 BHi-MT20 121 .....-----  
 BHi-MT19 121 .....-----  
 BHi-MT16 121 .....-----  
 BHi-MT23 121 .....-----  
 BHi-RM3 121 .....-----  
 BHi-RM21 121 .....-----  
 BHi-RM10A 121 .....-----  
 BHi-RM7 121 .....-----  
 PRJ-AP3 116 .....TT.....-..A..T.....-.....CTAGT  
 PRJ-AP2 116 .....TT.....-..A..T.....-.....CTAGT  
 PRJ-AP24 116 .....TT.....-..A..T.....-.....CTAGT  
 PRJ-AP22 114 .....G...TT.....-..A..T.....-.....CTAGT  
 PRJ-AP8 116 .....TT.....-..A..T.....-.....CTAGT  
 PRJ-AP10 116 .....TT.....-..A..T.....-.....CTAGT  
 consensus 121 \*\*\*,\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*

BHi-It6 176 -----  
 BHi-It9 176 -----  
 BHi-It5 176 -----  
 BHi-It11 176 -----  
 BHi-It7 176 -----  
 BHi-It12 176 -----  
 BHi-It8 176 -----  
 BHi-It24 176 -----  
 BHi-RM6 176 -----  
 BHi-RM2 176 -----  
 BHi-MT15 176 -----  
 BHi-RM1 176 -----  
 BHi-MT17 176 -----  
 BHi-MT20 176 -----  
 BHi-MT19 176 -----  
 BHi-MT16 176 -----  
 BHi-MT23 176 -----  
 BHi-RM3 176 -----  
 BHi-RM21 176 -----  
 BHi-RM10A 176 -----  
 BHi-RM7 176 -----  
 PRJ-AP3 174 ACATACATATGGTTTAAATACATATATGTATTATTCCTACTATACATGGTTTAAATACATA  
 PRJ-AP2 174 ACATACATATGGTTTAAATACATATATGTATTATTCCTACTATACATGGTTTAAATACATA  
 PRJ-AP24 174 ACATACATATGGTTTAAATACATATATGTATTATTCCTACTATACATGGTTTAAATACATA  
 PRJ-AP22 171 ACATACATATGGTTTAAATACATATATGTATTATTCCTACTATATATGGTTTAAATACATA  
 PRJ-AP8 173 ACATACATATGGTTTAAATACATATATGTATTATTCCTACTATACATGGTTTAAATACATA  
 PRJ-AP10 173 ACATACATATGGTTTAAATACATATATGTATTATTCCTACTATACATGGTTTAAATACATA  
 consensus 181 .....

BHi-It6 176 -----TTAGTACATACATATGGTTTAAATACATATATATGCTTTATTTTACATGTGC  
 BHi-It9 176 -----  
 BHi-It5 176 -----

BHi-It11 176 -----.....  
 BHi-It7 176 -----.....  
 BHi-It12 176 -----.....  
 BHi-It8 176 -----.....  
 BHi-It24 176 -----.....  
 BHi-RM6 176 -----.....  
 BHi-RM2 176 -----.....  
 BHi-MT15 176 -----.....A.....  
 BHi-RM1 176 -----.....A.....  
 BHi-MT17 176 -----.....A.....  
 BHi-MT20 176 -----.....A.....  
 BHi-MT19 176 -----.....A.....  
 BHi-MT16 176 -----.....A.....  
 BHi-MT23 176 -----.....A.....  
 BHi-RM3 176 -----.....A.....  
 BHi-RM21 176 -----.....A.....  
 BHi-RM10A 176 -----.....A.....  
 BHi-RM7 176 -----.....A.....  
 PRJ-AP3 234 CATATGGT.....TA.....  
 PRJ-AP2 234 CATATGGT.....TA.....  
 PRJ-AP24 234 CATATGGT.....TA.....  
 PRJ-AP22 231 CATATGGT.....TA.....  
 PRJ-AP8 233 CATATGGT.....TA.....  
 PRJ-AP10 233 CATATGGT.....TA.....  
 consensus 241 .....\*\*\*\*\*.....\*\*\*\*\*

BHi-It6 228 TTGTAAACATTAAACCATTA-TAACCATCTTTATGTAAAGAACAATCATTCA-CACCAT  
 BHi-It9 228 .....-.....  
 BHi-It5 228 .....-.....  
 BHi-It11 228 .....-.....  
 BHi-It7 228 .....-.....  
 BHi-It12 228 .....-.....  
 BHi-It8 228 .....-.....  
 BHi-It24 228 .....-.....  
 BHi-RM6 228 .....-.....  
 BHi-RM2 228 .....-.....  
 BHi-MT15 228 .....-.....  
 BHi-RM1 228 .....-.....  
 BHi-MT17 228 .....-.....  
 BHi-MT20 228 .....-.....  
 BHi-MT19 228 .....-.....  
 BHi-MT16 228 .....-.....  
 BHi-MT23 228 .....-.....T...  
 BHi-RM3 228 .....-.....  
 BHi-RM21 228 .....-.....  
 BHi-RM10A 228 .....-.....  
 BHi-RM7 228 .....-.....  
 PRJ-AP3 294 .....T...A...A...T.C...A.C.T...G...C...-.....  
 PRJ-AP2 294 .....T...A...A...T.C...A.C.T...G...C...-...-..  
 PRJ-AP24 294 .....T...A...A...T.C...A.C.T...G...C...-.....  
 PRJ-AP22 291 .....T...A...A...TCC...A.C.T...G...A...T...  
 PRJ-AP8 293 .C.....T...A...A...TCC.G.A.C.T...G...A.....  
 PRJ-AP10 293 .....T...A...A...TCC...A.C.T...G...A.....  
 consensus 301 \*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*...\*.\*.\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*

BHi-It6 286 A-CAAAGAAGACTCAAATAAACCATTAATAAGACCGAGAAATAAATTAATTCGACCTG  
 BHi-It9 286 .....  
 BHi-It5 286 .....  
 BHi-It11 286 .....  
 BHi-It7 286 .....  
 BHi-It12 286 .....  
 BHi-It8 286 .....  
 BHi-It24 286 .....  
 BHi-RM6 286 .....  
 BHi-RM2 286 .....  
 BHi-MT15 286 .....T.....  
 BHi-RM1 286 .....  
 BHi-MT17 286 .....A.....A...A.....



BHi-MT20 286 .-.....  
 BHi-MT19 286 .-.....  
 BHi-MT16 286 .-.....  
 BHi-MT23 286 .-.....  
 BHi-RM3 286 .-.....  
 BHi-RM21 286 .-.....  
 BHi-RM10A 286 .-.....  
 BHi-RM7 286 .-.....  
 PRJ-AP3 353 A.....G.....T.....TA.....  
 PRJ-AP2 352 A.....G.....T.....TA.....  
 PRJ-AP24 353 A.....G.....T.....TA.....  
 PRJ-AP22 351 A.....T.....TA...C.  
 PRJ-AP8 353 A.....T.....TA...C.  
 PRJ-AP10 353 A.....T.....TA...C.  
 consensus 361 \*.\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*

BHi-It6 345 ATAACCTGAGTAATCCCCATACCTCCATCACAAAATTTCTATGCAAGGACTCAACTATA  
 BHi-It9 345 .....  
 BHi-It5 345 .....  
 BHi-It11 345 .....  
 BHi-It7 345 .....  
 BHi-It12 345 .....  
 BHi-It8 345 .....  
 BHi-It24 345 .....  
 BHi-RM6 345 .....  
 BHi-RM2 345 .....  
 BHi-MT15 345 .....T.....  
 BHi-RM1 345 .....T.....  
 BHi-MT17 345 .....T.....A.  
 BHi-MT20 345 .....T.....  
 BHi-MT19 345 .....T.....  
 BHi-MT16 345 .....T.....  
 BHi-MT23 345 .....T.....  
 BHi-RM3 345 .....T.....  
 BHi-RM21 345 .....T.....  
 BHi-RM10A 345 .....T.....  
 BHi-RM7 345 .....T.....  
 PRJ-AP3 413 .....A.....T.....T.....  
 PRJ-AP2 412 .....A.....T.....T.....  
 PRJ-AP24 413 .....A.....T.....T.....  
 PRJ-AP22 411 .....A...C.....T...T...T.....  
 PRJ-AP8 413 .....A...C.....T...T.....  
 PRJ-AP10 413 .....A...C.....CC...T.....  
 consensus 421 \*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*

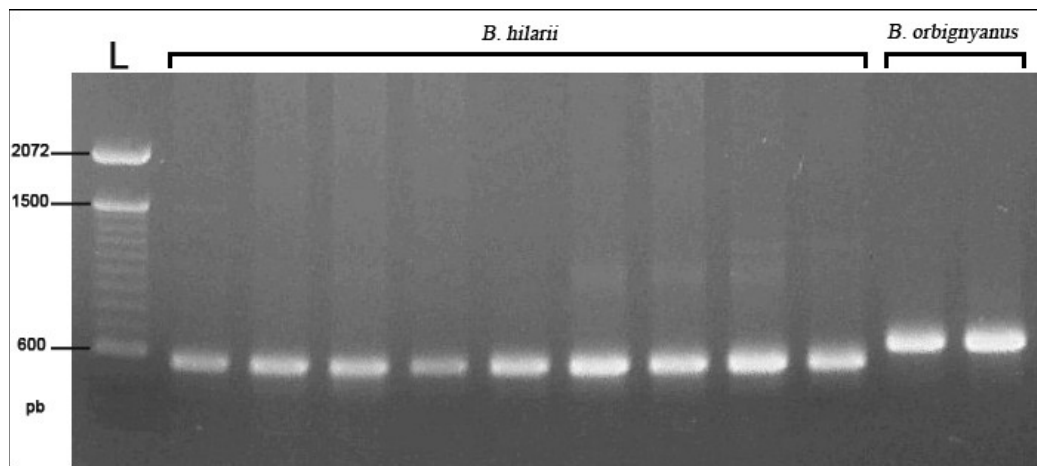
BHi-It6 405 A-TTGATCCTCAAAAGATTAATGTAGTAAGAGACCACCAACCAGTA  
 BHi-It9 405 .....G.  
 BHi-It5 405 .....TC.....  
 BHi-It11 405 .....TC.....  
 BHi-It7 405 .....TC.....  
 BHi-It12 405 .....TC.....  
 BHi-It8 405 .....TC.....  
 BHi-It24 405 .....TC.....  
 BHi-RM6 405 .....TC.....  
 BHi-RM2 405 .....TC.....  
 BHi-MT15 405 .G.....C.....  
 BHi-RM1 405 .....C.....  
 BHi-MT17 405 .G.....TC.....  
 BHi-MT20 405 .G.....TC.....  
 BHi-MT19 405 .G.....TC.....  
 BHi-MT16 405 .G.....TC.....  
 BHi-MT23 405 .G.....TC.....  
 BHi-RM3 405 .....TC.....  
 BHi-RM21 405 .....TC.....  
 BHi-RM10A 405 .....TC.....  
 BHi-RM7 405 .....TC.....  
 PRJ-AP3 473 ....G.A...T.-T.....  
 PRJ-AP2 472 ....G.A...T.-T.....

```

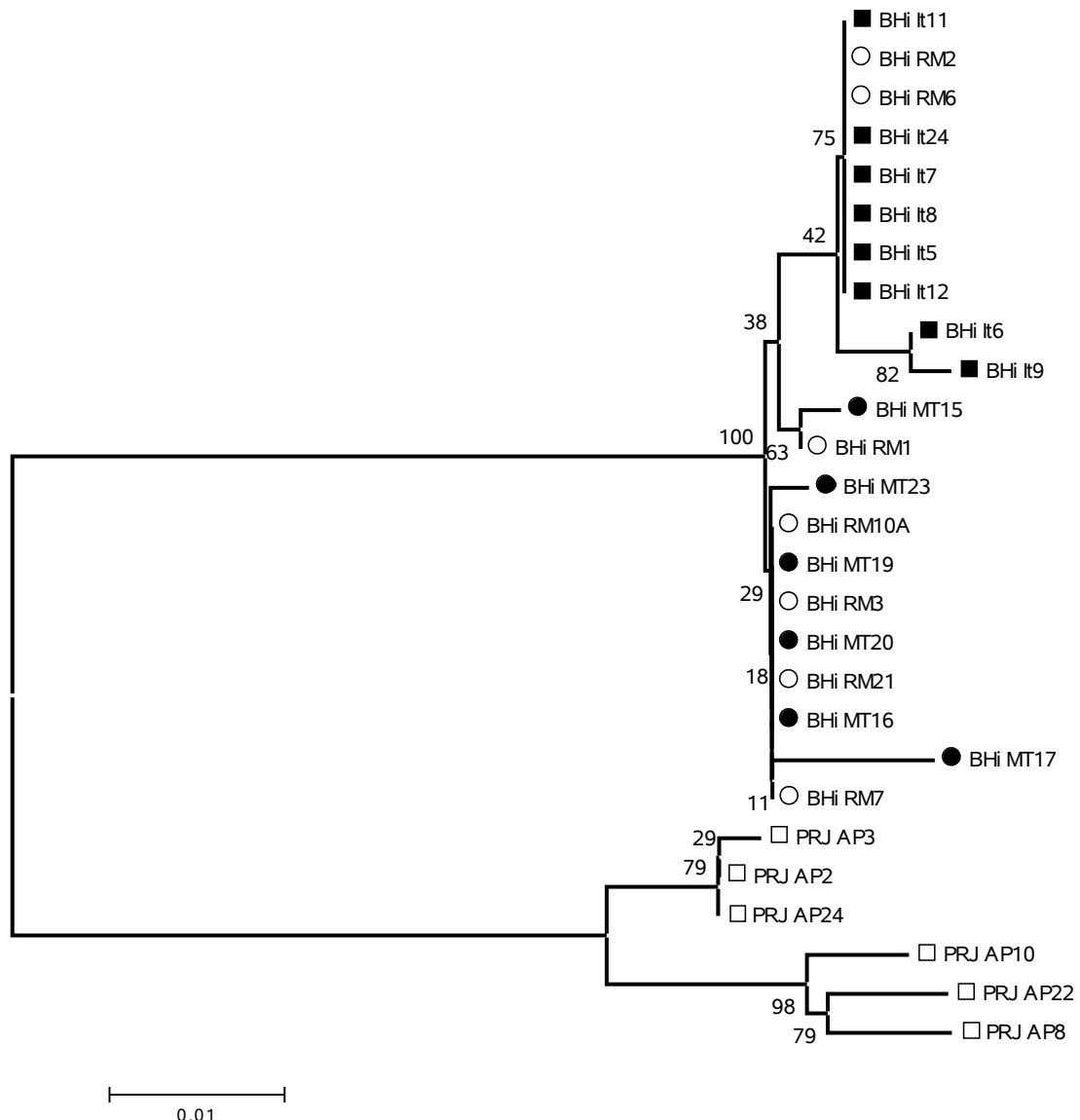
PRJ-AP24 473 .-...G.A...T.-T.....
PRJ-AP22 471 .-...G.A...T.-T.....
PRJ-AP8 473 .-...G.A...T.-T.....C.....
PRJ-AP10 473 .-...G.A...T.-T.....
consensus 481 *.**.*.*.***.*...*****.*****.*

```

**Figura 4.** Alinhamento múltiplo em ClustalW de seqüências nucleotídicas da região hipervariável do *D-loop* de espécimes de *Brycon* do reservatório de Itaipu (BHi-It), *Brycon hilarii* rio Paraguai (BHi-MT), rio Manso (BHi-RM), e espécimes de *Brycon orbignyanus* (PRJ-AP).



**Figura 5.** Perfil eletroforético da região *D-loop* do DNAmT amplificada a partir de amostras de DNA de espécimes de *B. hilarii* e *B. orbignyanus*. L: peso molecular (*Ladder* 100 pb, Invitrogen).



**Figura 6.** Dendrograma *neighbor-joining* construído com a matriz de distâncias Tamura e Nei estimadas com as seqüências *D-loop* de espécimes de *Brycon* do reservatório de Itaipu (■), espécimes de *B. hilarii* do rio Manso (○), do rio Paraguai (●), e com espécimes de *B. orbignyanus* do rio Paraná (□). Os valores de *bootstrap* foram obtidos com 10.000 reamostragens.

## DISCUSSÃO

As análises realizadas com dados RAPD e seqüências da região controle do DNAm<sub>t</sub> forneceram evidências da presença de *Brycon hilarii* no reservatório de Itaipu. Entre os espécimes do reservatório foram encontrados três haplótipos. Um dos haplótipos foi detectado em dois espécimes

provenientes do rio Manso. A separação de dois espécimes do reservatório ocorreu devido à diferença de apenas uma base em relação aos demais. O compartilhamento de haplótipos indica que a população de *B. hilarii* do reservatório de Itaipu está mais próxima geneticamente da população do rio Manso do que da população do rio Paraguai. Os espécimes de *B. orbignyanus* formaram um grupo separado, reforçando que as amostras encontradas no reservatório de Itaipu são espécimes de *B. hilarii*.

Embora *B. hilarii* seja originária da bacia do rio Paraguai, ela é encontrada esporadicamente, no médio rio Paraná, a jusante do reservatório de Itaipu, na bacia do rio Paraná (Agostinho & Júlio Jr., 1999). Este fato se deve provavelmente a comunicações ocorridas entre as duas bacias, podendo levar a mistura de sua ictiofauna. No entanto, a ictiofauna deste trecho inferior do rio Paraná estava, pelo menos parcialmente, isolada do médio Paraná, por causa da barreira natural constituída por Sete Quedas. Com a formação do reservatório de Itaipu, em 1982, houve o deslocamento desta barreira, possibilitando a invasão de espécies da parte inferior para o trecho superior do rio Paraná. Estudos mostram que várias espécies de peixes foram introduzidas após o fechamento da barragem de Itaipu na região da planície alagável do alto rio Paraná (Agostinho, 1992). Alguns anos após o fechamento das comportas, *B. hilarii* não era encontrada entre as espécies introduzidas. No entanto, esta introdução poderia ter ocorrido em baixos níveis há muitos anos, sendo detectada somente agora com os dados moleculares obtidos neste trabalho.

Uma outra hipótese para a introdução de *B. hilarii* no reservatório de Itaipu, é a soltura no ambiente natural, de espécimes provenientes de estoques de piscicultura. Esta hipótese é mais provável que a anterior, pois a maior parte dos espécimes de *B. hilarii* do reservatório compartilha um único haplótipo, como revelado pela análise das seqüências *D-loop* do DNAm. Por outro lado, os outros espécimes, provenientes do rio Manso e rio Paraguai, constituíram vários haplótipos distintos. Isto demonstra que são geneticamente mais variáveis que os espécimes do rio Paraná. Esta alta similaridade genética entre os indivíduos de *B. hilarii* do reservatório reflete uma prática comum dos estoques de piscicultura, que é o uso de baixo número de matrizes para a obtenção de alevinos, levando à perda da diversidade genética (Hara & Sekino, 2003; Wasko *et al.*, 2004; Porta *et al.*, 2006). Além disso, há relatos de que esta introdução seja proveniente de estoques de piscicultura e que tenha sido

feita no lado paraguaio do rio Paraná. No entanto, ela pode ter sido isolada, pois de acordo com pesquisadores da Engenharia de Pesca da UNIOESTE (comunicação pessoal), não tem sido registrada a presença de *B. hilarii* no canal de Itaipu, onde estudos periódicos vêm sendo realizados.

A variabilidade genética pode ser reduzida em uma população recentemente introduzida, e está relacionada a eventos, tais como o efeito de gargalo de garrafa, devido ao baixo número de colonizadores iniciais e a deriva genética. Este efeito será mais forte quando todos os colonizadores são derivados de uma mesma população. Sendo assim, a nova população estabelecida provavelmente será menos diversa geneticamente do que a população que a originou (Sakai *et al.*, 2001). No caso de *B. hilarii*, as populações do rio Manso e do rio Paraguai, ambos pertencentes à bacia do rio Paraguai, da qual esta espécie é nativa, possuem maior diversidade genética quando comparada à população introduzida. A perda da diversidade genética pode levar a várias conseqüências, tais como redução do sucesso reprodutivo, do crescimento populacional e da probabilidade de persistência da população. Além disso, a redução da variabilidade genética limita a capacidade da população de evoluir (Sakai *et al.*, 2001).

No reservatório de Itaipu, algumas espécies introduzidas foram bem sucedidas em sua colonização, tais como a curvina (*Plagioscion squamosissimus*) e o tucunaré (*Cichla monoculus*), assumindo importância na atividade pesqueira (Agostinho *et al.*, 1992). *Plagioscion squamosissimus* foi introduzida na bacia do rio Paraná através de estoques de piscicultura do nordeste (Torloni *et al.*, 1993). Estudos com marcadores moleculares demonstraram que essa nova população é geneticamente menos variável que a população original (Panarari, 2003). Apesar disso, seu estabelecimento na bacia do rio Paraná tem sido bem sucedido. Em relação à *B. hilarii*, pelo seu registro recente no reservatório de Itaipu, não se sabe se esta espécie obterá êxito em sua colonização. No entanto, por ser uma espécie migradora, como *B. orbignyanus*, que é raramente encontrada neste reservatório, sua sobrevivência pode ser afetada pela barragem, que constitui um obstáculo para sua reprodução. A bacia do alto rio Paraná possui um longo trecho represado, que foi responsável pela redução de várias espécies de peixes migradoras, tais como *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado), *Zungaro zungaro* (jaú),

*Salminus brasiliensis* (dourado), *S. hilarii* (tabarana), entre outras (Sirol & Britto, 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo revelam a presença de *B. hilarii* pela primeira vez no reservatório de Itaipu. Pelas análises realizadas e através de relatos de pesquisadores, há evidências de que *B. hilarii* tenha sido introduzida no reservatório de Itaipu através de estoques de piscicultura. Se obtiver sucesso em sua colonização, no entanto, os riscos que esta introdução pode representar para a fauna local são desconhecidos. Além disso, seu sucesso pode ser afetado pela variabilidade genética, que como demonstrado, é menor do que nos locais onde esta espécie é originária. Sugere-se estudos adicionais, no sentido de verificar o estabelecimento de *B. hilarii* na bacia do rio Paraná e suas possíveis conseqüências para as comunidades que habitam este sistema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboim, M.A., Menezes, G.M., Schlitt, T. & Rogers, A.D. (2005). Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. *Molecular Ecology* **14** (5), 1343-1354.

Agostinho, A.A. (1992). Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios. In: *Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil* (Agostinho A.A. & Benedito-Cecílio E., ed.), pp. 106-121. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá.

Agostinho, A.A. & Júlio Jr, H.F. (1996). Ameaça ecológica: peixes de outras águas. *Rev. Ciência Hoje*. CNPq, 124 (21), 36-44.

Agostinho, A. A. & Júlio Jr, H. F. (1999). Peixes da bacia do alto rio Paraná. In *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais* (Lowe-McConnel R.H, ed.), pp. 374-400. São Paulo: EDUSP.

Amin, O.M. & Minckley, W. L. (1996). Parasites of some fish introduced into an Arizona Reservoir, with notes on introductions. *Journal of the Helminthological Society of Washington* **63** (2), 193-200.

Bosch, J.; Rincon, P.A.; Boyero, L. & Martinez-Solano, I. (2006). Effects of introduced salmonids on a montane population of Iberian frogs. *Conservation Biology* **20** (1), 180-189.

Bremer, J.R.A., Mejuto, J., Gómez-Marquez, J., Boan, F., Carpintero, P., Rodriguez, J.M., Vinas, J., Greig, T.W. & Ely, B. (2005). Hierarchical analyses of genetic variation of samples from breeding and feeding grounds confirm the genetic partitioning of northwest Atlantic and South Atlantic populations of swordfish (*Xiphias gladius* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **327** (2), 167-182.

Casal, C.M.V. (2006). Global documentation of fish introductions the growing crisis and recommendations for action. *Biological Invasions* **8** (1), 3-11.

Coates, D. (1998). Codes of practice for the stocking and introduction of fish. In *Stocking and Introduction of Fish* (Cowx I.G., ed.), pp. 383-396. Hull International Fisheries Institute, University of Hull, UK.

Cronin, M.A., Spearman, W.J., Wilmot, R.L., Patton, J.C. & Bickham, J.W. (1993). Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of Polymerase Chain Reaction (PCR) products. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**, 708-715.

Davey, M.L., O'Brien, L., Ling, N. & Gleeson, D.M. (2003). Population genetic structure of the Canterbury mudfish (*Neochanna burrowsius*): biogeography and conservation implications. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **37** (1), 13-21.

de Jong, M.C.V., Gibson, R.J. & Cowx, I.G. (2004). Impacts of stocking and introduction on freshwater fisheries of Newfoundland and Labrador, Canada. *Fisheries Management and Ecology* **11** (3-4), 183-193.

Figueredo, C.C. & Giani, A. (2005). Ecological interactions between Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) and the phytoplanktonic community of the Furnas Reservoir (Brazil). *Freshwater Ecology* **50** (8), 1391-1403.

Galli, P., Stefani, F., Benzoni, F. & Zullini, A. (2005). Introduction of alien host-parasite complexes in a natural environment and the symbiota concept. *Hydrobiologia* **548**, 293-299.

- Golani, D. (2000). Introduction of fishes to the freshwater system of Israel. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **52** (2), 47-60.
- Graça, W.J. & Pavanelli, C.S. (2006). *Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes*. Maringá: EDUEM. (no prelo).
- Hara, M. & Sekino, M. (2003). Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture* **217** (1-4), 107-114.
- Kang, T.W., Lee, E.H., Kim, M.S., Paik, S.G., Kim, S. & Kim C.B. (2005). Molecular phylogeny and geography of Korean medaka fish (*Oryzias latipes*). *Molecules and Cells* **20** (1), 151-156.
- Kawamura, K., Yonekura, R., Katano, O., Taniguchi, Y. & Saitoh, K. (2006). Origin and dispersal of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea. *Molecular Ecology* **15** (3), 613-621.
- Kerr, S.J., Brousseau, C.S. & Muschett, M. (2005). Invasive aquatic species in Ontario: a review and analysis of potential pathways for introduction. *Fisheries* **30** (7), 21-30.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150-163.
- Leyse, K.E., Lawler, S.P. & Strange, T. (2004). Effects of an alien fish, *Gambusia affinis*, on an endemic California fairy shrimp, *Linderiella occidentalis*: implications for conservation of diversity in fishless waters. *Biological conservation* **118** (1), 57-65.
- Ling, N. (2004). *Gambusia* in New Zealand: really bad or just misunderstood? *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **38** (3), 473-480.
- Lowe-McConnel, R.H. (1999). A fauna de peixes neotropical. In *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais* (Lowe-McConnel R.H, ed.), pp. 129-168. São Paulo: EDUSP.
- Meyer, A., Kocher, T.D., Basasibwaki P. & Wilson, A.C. (1990). Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* **347** (6293): 550-553.



Mitchell, A.J. & Kelly, A.M. (2006). The public sector role in the establishment of grass carp in the United States. *Fisheries* **31** (3), 113-121.

Monesi, N., Jacobs-Lorena, M. & Paço-Larson, M.L. (1998). The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **107** (8), 559-569.

Orizaola, G. & Brana, F. (2006) Effect of salmonid introduction and other environmental characteristics on amphibian distribution and abundance in mountain lakes of northern Spain. *Animal Conservation* **9** (2), 171-178.

Ortubay, S., Cussac, V., Battini, M., Barriga, J., Aigo, L., Alonso, M., Macchi, P., Reissig, M., Yoshioka, J. & Fox, S. (2006). Is the decline of birds and amphibians in a steppe lake of northern Patagônia a consequence of limnological changes following fish introduction? *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems* **16** (1), 93-105.

Panarari, R.S. (2003). *Variabilidade e estrutura genética de populações de Plagioscion squamosissimus (Perciformes, Sciaenidae) da bacia do rio Paraná*. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Pr, Brasil.

Porta, J., Porta, J.M., Martinez-Rodriguez, G. & Alvarez, M.C. (2006). Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Sole senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* **251** (1), 46-55.

Rosecchi, E., Crivelli, A.J. & Catsadorakis, G. (1993). The establishment and impact of *Pseudorasbora-parva*, an exotic fish species introduced into lake Mikri Prespa (North-Western Greece). *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems* **3** (3), 223-231.

Ruiz-Carus, R., Matheson, R.E., Roberts, D.E. & Whitfield, P.E. (2006). The western Pacific red lionfish, *Pterois volitans* (Scorpaenidae), in Florida: Evidence for reproduction and parasitism in the first exotic marine fish established in state waters. *Biological Conservation* **128** (3), 384-390.

Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., Baughman, S., Cabin, R.J., Cohen, J.E., Ellstrand, N.C., McCauley, D.E., O'Neil, P., Parker, I.M., Thompson, J.N. & Weller, S.G. (2001). The population biology of invasive species. *Annual Review Ecology and Systematics*. **32**, 305-332.

Sapota, M.R. (2004). The round goby (*Neogobius melanostomus*) in the Gulf of Gdansk – a species introduction into the Baltic Sea. *Hydrobiologia* **514** (1-3), 219-224.

Sirol, R.N. & Britto, S.G. (2005). Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata* (Nogueira M.G., Henry R. & Jorcin A., ed.), pp. 275-284. São Carlos: RiMa.

Stepien, C.A., Brown, J.E., Neilson, M.E. & Tumeo, M.A. (2005). Genetic diversity of invasive species in Great Lakes versus their Eurasian source populations: insights for risk analysis. *Risk Anal.* **25** (4), 1043-1060.

Torloni, C.E.C.; J.J. Santos, A.A. Carvalho Jr & Corrêa, A.R.A. (1993). A pescada-do-piauí *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Perciformes) nos reservatórios da CESP – Companhia Energética de São Paulo. São Paulo: CESP, 23 p. (Série Pesquisa e desenvolvimento, 084).

Vincent, A.G. & Font, W.F. (2003). Seasonal and yearly population dynamics of two exotic helminthes, *Camallanus cotti* (nematode) and *Bothriocephalus acheilognathi* (cestoda), parasitizing exotic fishes in Waianu Stream, O'ahu, Hawaii. *Journal of Parasitology* **89** (4), 756-760.

Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C., Senhorini, J.A. & Foresti, F. (2004). Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *J. Appl. Ichthyol.* **20**, 48-52.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.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.

## CAPÍTULO 3

### VARIABILIDADE MOLECULAR EM *Brycon pesu* Müller & Troschel, 1845 (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) DA BACIA ARAGUAIA-TOCANTINS.

#### RESUMO

*Brycon pesu*, também conhecida como “beiradeira”, é um peixe de pequeno porte com distribuição na bacia Amazônica, bacia do rio Orinoco e bacias costeiras do nordeste da América do Sul. Acredita-se que *B. pesu* seja um complexo de espécies, pois os espécimes encontrados fora da Guiana, sua localidade tipo, possuem algumas diferenças morfológicas. No entanto, estes espécimes ainda não foram descritos, sendo todos identificados como *Brycon cf. pesu*. Atualmente, indivíduos da bacia Araguaia-Tocantins descritos como *B. cf. pesu*, têm sido separados em dois morfótipos, *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2, devido a uma diferença na coloração da nadadeira anal. *Brycon* sp2 possui a nadadeira anal com uma faixa marginal avermelhada, o que o distingue morfológicamente de *Brycon* sp1. No presente trabalho, marcadores nucleares e mitocôndrias foram utilizados com o objetivo de verificar a hipótese de que os morfótipos *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2 são espécies distintas. Exemplares de ambos morfótipos foram coletados na escada de peixes da Usina Hidrelétrica do Lajeado e no rio Palmas, na bacia Araguaia-Tocantins. Foram analisados 35 locos gerados pela amplificação com cinco *primers* ISSR, não sendo detectada a presença de bandas espécie-específicas. O perfil eletroforético obtido pela amplificação da região espaçadora do DNAr 5S (NTS) não permitiu a diferenciação dos morfótipos. Estes resultados foram corroborados pela análise de seqüências nucleotídicas da região controle do DNAm (450 pb), onde foram detectados 24 sítios nucleotídicos polimórficos, representando apenas 5% de polimorfismo. Portanto, o baixo polimorfismo detectado pelos marcadores ISSR, NTS e *D-loop* do DNAm fortemente sustenta a hipótese de que ambos morfótipos, *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2, pertencem a uma mesma espécie, inserida em *Brycon cf. pesu*. Estudos adicionais poderão fornecer informações conclusivas sobre a evidência, aqui apresentada, de que nestes morfótipos a coloração da nadadeira anal deve ser um polimorfismo intraespecífico, possivelmente relacionado a fatores ambientais.

## ABSTRACT

*Brycon pesu*, popularly known as beiradeira, is a small-sized fish distributed throughout the Amazon and Orinoco basins and other coastal basins of the northeastern South America. It has been reported that *B. pesu* is a set of species since specimens found outside Guyana, its native habitat, have morphological differences. Species, however, have never been described and have been merely identified as *B. pesu*. *Brycon cf. pesu* specimens from the Araguaia-Tocantins basin have currently been separated into two morphotypes, *Brycon* sp1 and *Brycon* sp2, owing to different coloring in their anal fin. *Brycon* sp2 has a reddish margin stripe on the anal fin which morphologically distinguishes it from *Brycon* sp1. Current research deployed nuclear and mitochondrial markers to verify the hypothesis that morphotypes *Brycon* sp1 and *Brycon* sp2 are distinct species. Specimens from the two morphotypes were collected from the Lajeado Hydroelectric Plant and from the Palmas River in the Araguaia-Tocantins basin. Thirty-five loci from five ISSR primers amplification were analyzed but no species specific bands were detected. Electrophoresis from 5S rDNA (NTS) spacing region amplification failed to show any differentiation in morphotypes. Results were corroborated by nucleotide sequences analysis of mtDNA control region in which 24 polymorphic nucleotide sites, representing 5% polymorphism, were detected. Low polymorphism detected by ISSR, NTS and mtDNA D-loop markers strongly maintain the hypothesis that the two morphotypes *Brycon* sp1 and *Brycon* sp2 belong to the same species within the *Brycon pesu* set. Further studies have to be undertaken so that conclusive information on the above evidence that the coloring of anal fin is an intraspecies polymorphism, possibly related to environmental factors, may be obtained.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Brycon* compreende cerca de 40 espécies, e está entre os principais gêneros tropicais de peixes de água doce, distribuídos na América Central e do Sul (Lima, 2003). Constitui várias espécies de grande porte, migradoras, das quais muitas são importantes recursos pesqueiros. *Brycon pesu* Müller & Troschel 1845, também conhecida como “beiradeira”, é um peixe de pequeno porte, que pode alcançar até 12 cm de comprimento padrão. Possui ampla distribuição na América do Sul, sendo encontrado na bacia do rio Amazonas, rios da Guiana, no Suriname, Guiana Francesa, e na bacia do rio Orinoco (Lima, 2003). Ocorre sobre areias e rochas, em águas correntes rápidas (Planquette *et al.*, 1996). Possui o hábito de se alimentar nas margens, principalmente de insetos terrestres. Acredita-se que *B. pesu* seja um complexo de espécies pois os espécimes encontrados fora da Guiana, sua localidade-tipo, possuem algumas diferenças morfológicas. No entanto, estes espécimes ainda não foram descritos, sendo todos identificados como *B. pesu*. Portanto, neste trabalho este complexo de espécies será referido como *Brycon cf. pesu*.

Atualmente, indivíduos de *B. cf. pesu* provenientes da bacia Araguaia-Tocantins têm sido separados em dois morfótipos, *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2, devido a uma diferença na coloração da nadadeira anal. *Brycon* sp2 possui a nadadeira anal com uma faixa marginal avermelhada (Fig. 1), o que o distingue morfológicamente de *Brycon* sp1 (Fig.2). Além disso, há a presença de intermediários que também são identificados como *Brycon* sp2.



**Figura 1.** Espécime de *Brycon* sp2 (comprimento padrão 12 cm) da bacia Araguaia-Tocantins.



**Figura 2.** Espécime de *Brycon* sp1 (comprimento padrão 8 cm) da bacia Araguaia-Tocantins.

A variabilidade genética nos permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes. Além da sua importância evolutiva, ela pode ainda ser usada como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversos ramos (Avice, 2004). As ferramentas básicas utilizadas para estudos com variabilidade genética são os marcadores moleculares, que são seqüências de bases com localização única no genoma e cujas variações podem ser rastreadas em famílias e populações, podendo ser ou não parte de um gene. Há uma grande variedade destes marcadores atualmente, permitindo o estudo tanto do DNA nuclear como do DNA mitocondrial, e até mesmo do RNA. Os marcadores moleculares podem ser utilizados em estudos da variabilidade genética de populações (Sofia *et al.*, 2006; Theodorakis *et al.*, 2006), de filogenia (Lavoue & Sullivan, 2004; Feulner *et al.*, 2006), de taxonomia (Huff *et al.*, 2004) e identificação de espécies crípticas (Sandoval-Castillo *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2005). Em alguns casos, análise baseada apenas em caracteres morfológicos pode não ser suficiente para solucionar problemas relacionados à taxonomia. Desta forma, o uso de marcadores moleculares torna-se relevante e tem sido bastante comum nos últimos anos.

A técnica ISSR (*inter simple sequence repeat*), baseada em PCR, emprega um único *primer* com a seqüência repetitiva interna de um microssatélite, amplificando a região que intercala dois blocos de microssatélites. Conseqüentemente, o resultado do ISSR pode ser interpretado como um mapeamento de microssatélites no genoma dos organismos estudados. Os *primers* ISSR com seqüências tetranucleotídicas têm se

mostrado eficientes na produção de padrões polimórficos intraespecíficos informativos (Gupta *et al.*, 1994) e interespecíficos (Fernandes-Matioli *et al.*, 2000).

O gene do DNA ribossômico (DNAr) 5S compreende uma seqüência codificante altamente conservada (RNAr 5S) e um espaçador não-transcrito (NTS) de tamanho variável conforme a espécie. O padrão de variantes de DNAr 5S, verificados principalmente nas regiões espaçadoras intergênicas, constitui um método eficiente para obtenção de marcadores espécie-específicos (Martins & Galetti Jr., 2001; Robles *et al.*, 2005).

Por sua vez, seqüências de DNA do genoma mitocondrial são marcadores genéticos baseados em polimorfismos de sítios nucleotídicos e têm sido usadas como rotina em estudos de diversidade genética dentro e entre populações de uma mesma espécie e de diferentes espécies. A região controle é a principal seqüência de DNA não-codificadora e a mais variável do DNAm de metazoários, incluindo-se os peixes. É caracterizada pelo *displacement loop*, conhecido como *D-loop*, um segmento de DNA que marca o início da duplicação da molécula de DNA. A região controle contém seqüências altamente polimórficas, e a sua taxa de substituição nucleotídica é de duas a cinco vezes mais rápida do que aquela observada para genes codificadores de proteínas. Uma vez que mutações acumulam-se mais rapidamente na região controle, principalmente na região 5', esta é a principal seqüência do DNAm escolhida para estudos genético-populacionais e evolutivos entre espécies aparentadas muito próximas e entre populações de uma única espécie, inclusive em peixes (Kang *et al.*, 2005; Aboim *et al.*, 2005).

No presente trabalho, marcadores moleculares ISSR, região espaçadora do DNAr 5S e seqüências nucleotídicas da região controle do DNA mitocondrial foram analisadas com o objetivo de verificar a hipótese de que os morfótipos *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2 são espécies distintas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Área de estudo**

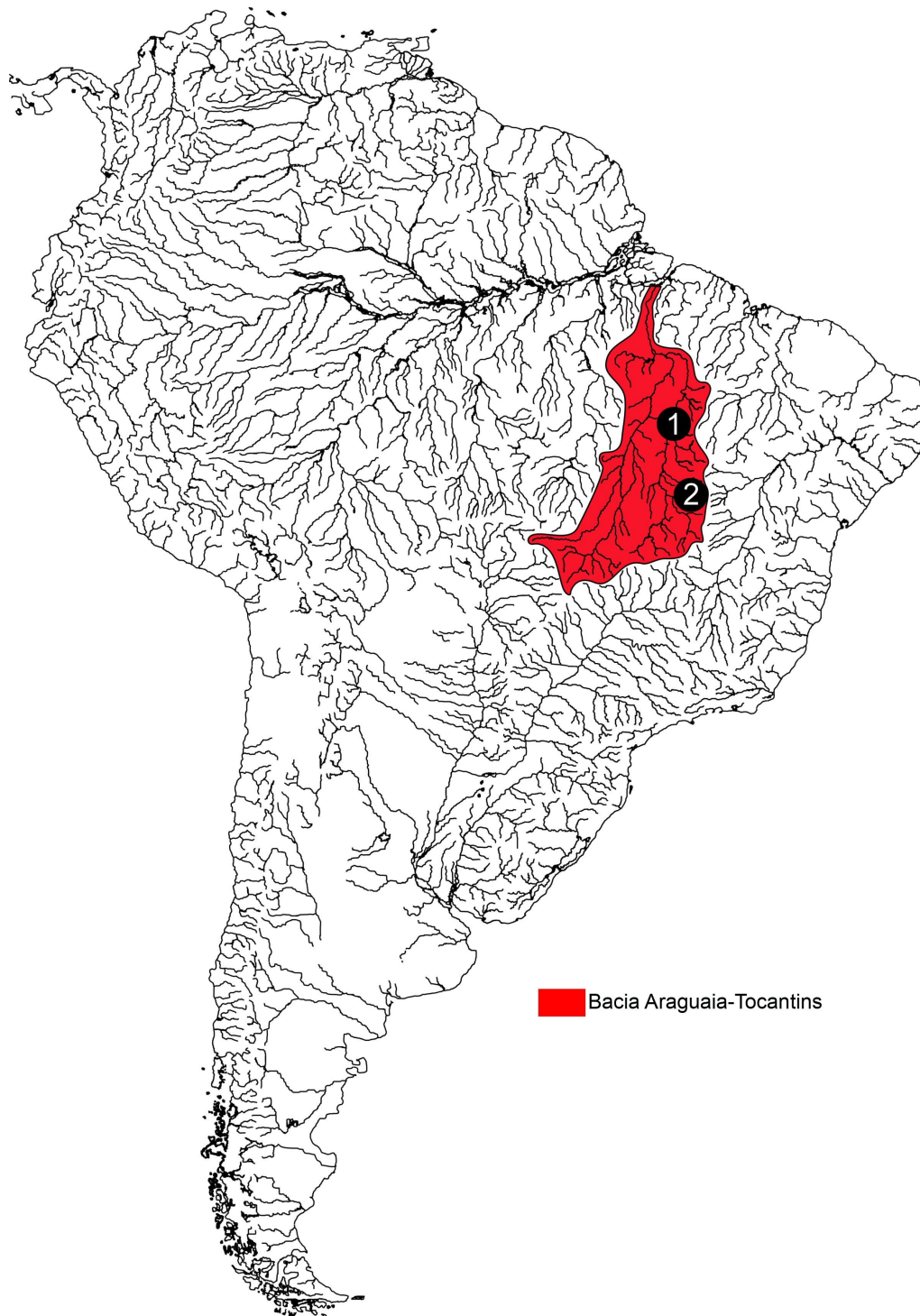
A Bacia Araguaia-Tocantins drena 767.000 km<sup>2</sup>, dos quais 343.000 km<sup>2</sup> correspondem à bacia do rio Tocantins, 382.000 km<sup>2</sup> ao Araguaia (seu principal

afluente) e 42.000 km<sup>2</sup> ao Itacaiunas (o maior contribuinte do curso inferior). Limitado pelas bacias do Paraná-Paraguai (Sul), do Xingu (Oeste), do São Francisco (Leste) e Parnaíba (Nordeste), o rio Tocantins, o tributário mais a sudeste da bacia Amazônica, integra a paisagem do Planalto Central, composta por cerrados que recobrem 76% da bacia. O curso inferior do rio Tocantins e o rio Itacaiunas são cobertos por floresta amazônica. Entre estas duas grandes regiões, a bacia cruza uma zona de transição, com ambientes pré-amazônicos.

### **Material biológico**

Doze exemplares de cada morfótipo de *B. cf. pesu* foram coletados na escada de peixes da Usina Hidrelétrica do Lajeado (09°46'S 48°21'W), construída sobre o rio Tocantins, e no rio Palmas, seu afluente, na bacia Araguaia-Tocantins (Fig. 3). As amostras de tecido muscular foram preservadas em álcool comercial. Material testemunho dos morfótipos *Brycon* sp1 (UMT 2281; 3099; 3102; 3115; 3116; 3125; 3128; 3133; 3136; 3139) e *Brycon* sp2 (UMT 2282; 2286; 3097; 3101; 3106; 3108; 3109; 3118; 3120; 3121) são encontrados na coleção de peixes do laboratório de Ictiologia Sistemática da Universidade Federal de Tocantins.





**Figura 3 .** Bacia Araguaia-Tocantins; 1 – escada de peixes da usina hidrelétrica de Lajeado; 2 - rio Palmas.

### ***Extração e quantificação do DNA genômico***

A extração de DNA foi efetivada com utilização da metodologia baseada em fenol/clorofórmio (Monesi *et al.*, 1998). Amostras de tecido muscular, com

cerca de 100 mg foram maceradas em nitrogênio líquido. Ao extrato obtido adicionou-se tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Espermidina 0,15 mM), tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%) e proteinase K (20 µg/µL). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria com agitação, a 37°C por cerca de uma hora. Após, efetuou-se a purificação do DNA através de lavagens com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio. Na etapa seguinte, o DNA foi precipitado com solução salina (NaCl 0,2 M) e etanol gelado. Este precipitado foi submetido a várias centrifugações com etanol 70% e 100% e finalmente ressuspenso em TE (Tris 1 mM, EDTA 0,1 mM) contendo RNase. Posteriormente o DNA de todas as amostras foi quantificado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL). Essencialmente, a quantificação consistiu na comparação do DNA contido em 1 µL de cada amostra com quantidades conhecidas de DNA do fago λ (Invitrogen).

### **ISSR e análise dos dados**

Os *primers* ISSR com repetições tetranucleotídicas (GGAC)<sub>3</sub>A, (GGAC)<sub>3</sub>C, (GGAC)<sub>3</sub>T, (AACC)<sub>4</sub> e (GGAC)<sub>4</sub> foram selecionados para análise. A mistura de reação de amplificação consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primer* 0,46 µM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reação de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), DNA (10 ng) e água estéril deionizada para completar 13 µL. 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. As condições de amplificação do DNA foram recomendadas por Albert *et al.* (1999). Amostras de 10 µL da mistura de reação de PCR, após amplificação, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL). A eletroforese foi realizada em tampão TBE (Tris-Borato), a 5 V.cm<sup>-1</sup>, durante 3-4 horas. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob radiação ultravioleta e o gel foi fotografado para análise. O tamanho dos fragmentos pôde ser estimado pela comparação com marcador *Ladder* 100 pb (Invitrogen). Comparações entre os indivíduos foram feitas para avaliar a diversidade genética baseada na proporção de locos polimórficos dentro de cada grupo.

## **Região espaçadora do DNAr 5S e análise de dados**

Para a amplificação do gene DNAr 5S e seus espaçadores (NTSs – *Non Transcribed Spacers*) aplicou-se a técnica de PCR, onde empregou-se o conjunto de iniciadores A (5 – TACGCCCGATCTCGTCCGATC – 3') e B (5' – CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC – 3'). Analisaram-se cinco amostras de cada morfótipo. A mistura da reação de amplificação consistiu basicamente de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 2,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U/Reação de *Taq* DNA polimerase, DNA genômico 15 ng e água deionizada e autoclavada para completar 25 µL. O fragmento de DNA correspondente à região espaçadora foi amplificado em 1 ciclo de 5 min a 94°C, 1 min a 95°C, 30 s a 63°C, 1 min a 72°C e 34 ciclos de 1 min a 95°C.

Cerca de 5 µL do DNA amplificado de cada amostra foram fracionados em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídeo, e submetido em campo elétrico com 5 V.cm<sup>-1</sup>, durante aproximadamente três horas. Um controle negativo sem DNA foi incluso em cada reação de PCR. O padrão de bandas produzido foi visualizado em um transiluminador e fotografado sob luz UV para posterior análise, que foi baseada na comparação do perfil eletroforético obtido para cada morfótipo.

## **DNA mitocondrial e análise de dados**

A região controle do genoma mitocondrial foi parcialmente amplificada por PCR a partir do DNA total de cinco espécimes de *Brycon* sp1 e cinco de *Brycon* sp2 provenientes da bacia Araguaia-Tocantins. A amplificação foi realizada utilizando-se o par de *primers D-loop* L 5'-AGAGCGTCGGTCTTGTAACC-3' (Cronin *et al.*, 1993) e H16498 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (Meyer *et al.*, 1990). Para o seqüenciamento foram realizadas duas amplificações independentes. Além disso, foram seqüenciadas as duas fitas de cada produto de reação.

A mistura de reação de amplificação consistiu basicamente de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 2,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U/Reação de *Taq* DNA polimerase, DNA genômico 15 ng e água deionizada e autoclavada para completar 25 µL. O

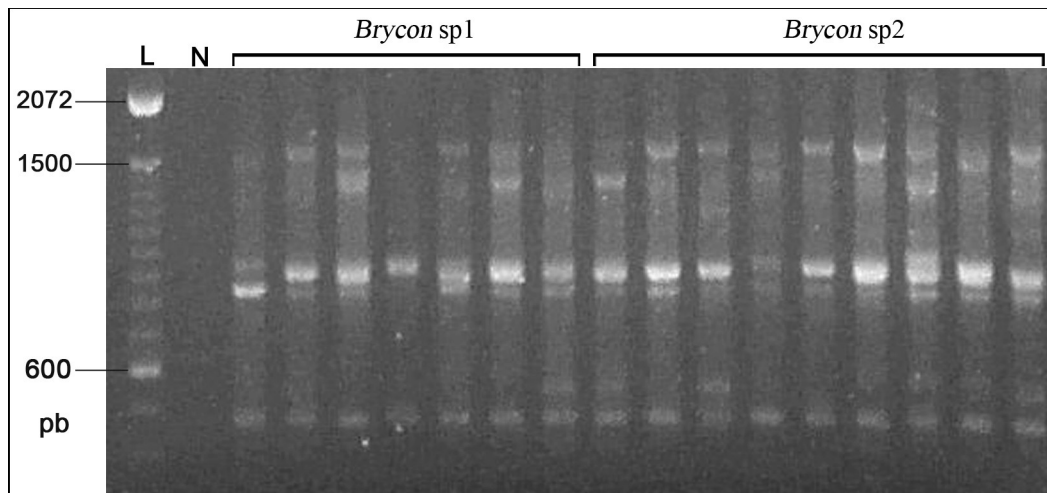
fragmento de DNA foi amplificado em 1 ciclo de 4 min a 94°C, 30 s a 56°C e 2 min a 72°C, 40 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 56°C e 2 min a 72°C, e um último ciclo de 15 s a 94°C, 30 s a 56°C e 10 min a 72°C. Amostras de DNA (cerca de 50 ng) amplificado em cada reação de PCR foram usadas diretamente em reações de seqüenciamento com *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing*, em um seqüenciador automático ABI-3100 (Perkin Elmer), de acordo com instruções do fabricante.

As seqüências nucleotídicas foram alinhadas e analisadas no programa Vector NTI Suite versão 6.0 (Informax, Inc.). Todas as seqüências de DNAm foram alinhadas com o programa CLUSTALW. Análises genéticas das seqüências mitocondriais foram realizadas com o programa MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2004). Foram determinadas as distâncias genéticas de Tamura e Nei entre os indivíduos. A matriz de distâncias foi utilizada para construir um dendrograma com o algoritmo *neighbor-joining*, com análises de *bootstrap* baseadas em 10.000 reamostragens.

## RESULTADOS

### ISSR

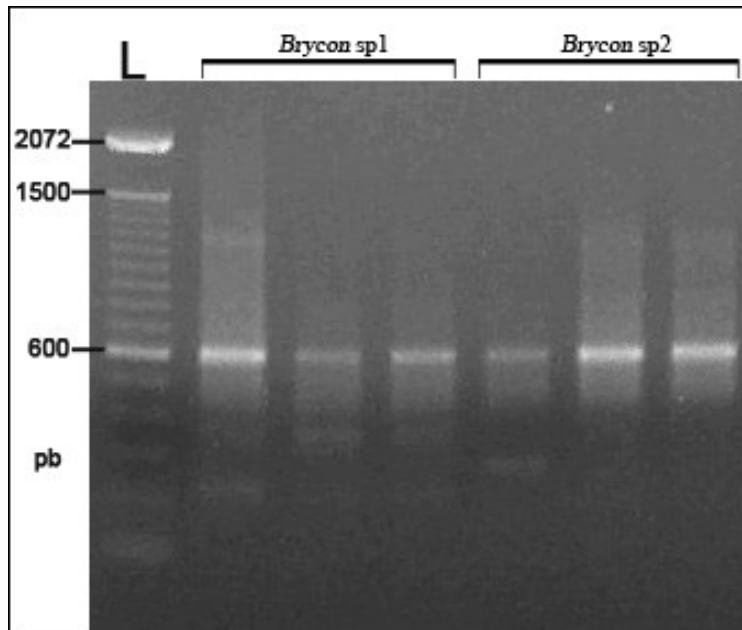
Para os *primers* (GGAC)<sub>3</sub>A e (GGAC)<sub>3</sub>T foram analisados 11 indivíduos de *Brycon* sp1 e 12 de *Brycon* sp2. Para os *primers* (GGAC)<sub>3</sub>C, (AACC)<sub>4</sub> e (GGAC)<sub>4</sub> foram analisados quatro indivíduos de cada morfótipo. Os cinco *primers* ISSR produziram de cinco a dez bandas nítidas e reproduzíveis, totalizando 35 locos. Os fragmentos amplificados variaram, em comprimento, no intervalo de 300-1900 pb. Quando os locos amplificados dos morfótipos *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2 foram analisados simultaneamente, foram detectadas a presença de 14 bandas monomórficas, ou seja, o alelo dominante está presente em todos os indivíduos de ambos morfótipos. Por outro lado, quando analisados dentro de cada morfótipo, não houve locos monomórficos exclusivos. O morfótipo *Brycon* sp1 apresentou 17 locos polimórficos (48,6%), enquanto o morfótipo *Brycon* sp2 apresentou 15 (42,8%). O perfil eletroforético produzido (Fig. 4) foi altamente similar entre os dois morfótipos, sendo observado apenas alguns polimorfismos isolados.



**Figura 4.** Perfis eletroforéticos de marcadores ISSR dos morfótipos *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2 obtidos com o *primer* (GGAC)<sub>3</sub>T. L: contém os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* 100 pb, Invitrogen); N: controle negativo, sem DNA.

### ***Região espaçadora do DNAr 5S***

A amplificação da região espaçadora do gene do DNAr 5S produziu apenas um fragmento nítido, com 600 pb. Este fragmento esteve presente em todos os indivíduos analisados de *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2. Não foi detectada a presença de bandas espécie-específicas, à exceção de uma banda pouco nítida de 350 pb presente apenas em *Brycon* sp1. Análises posteriores poderão ser realizadas com maior número de espécimes, no sentido de verificar a reprodutibilidade deste fragmento. Portanto, o perfil eletroforético obtido não demonstrou diferenciação genética acentuada entre os morfótipos (Fig. 5).



**Figura 5.** Perfil eletroforético obtido pela amplificação da região espaçadora do gene DNAr 5S, para os morfótipos *Brycon sp1* e *Brycon sp2*. L: contém os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* 100 pb, Invitrogen).

### DNA mitocondrial

Um fragmento de aproximadamente 450 pb, correspondente à região variável do *D-loop* do DNAm<sub>t</sub> foi seqüenciado e utilizado para análise (Fig. 6). Foram identificados 24 sítios nucleotídicos polimórficos distribuídos ao longo do fragmento seqüenciado. Este valor corresponde a cerca de 5% do total do número de seqüências analisadas. As substituições nucleotídicas consistiram apenas em transições.

Como representado pelo dendrograma *neighbor-joining* (Fig. 7) construído a partir da matriz de distâncias de Tamura e Nei, o polimorfismo identificado não separou os espécimes *Brycon sp1* e *sp2*. Além disso, baixos valores de *bootstrap* entre os grupos indicam baixa variabilidade genética entre os indivíduos.

Bry-sp1-3	1	TATGTACTAGTACATATTATTCATGTACTAGTACATATTATTCATGTACTAGTACATATT
Bry-sp2-14	1	.....
Bry-sp1-8	1	.....C.....C.
Bry-sp2-11	1	.....

```

Bry-sp2-12      1 C.....
Bry-sp1-10     1 .....
Bry-sp1-2      1 .....
Bry-sp1-1      1 .....C.....
Bry-sp2-9      1 .....C.....C.....
Bry-sp2-5      1 .....C.....C.....C.....
consensus      1 .*****.*****.*****.*****.*****.*

Bry-sp1-3      61 ATTCATGTACTAGTACATATTATTCATGTACTAGTACATATTATTCATGTACTAGTACAT
Bry-sp2-14     61 .....
Bry-sp1-8      61 .....C.....C.....
Bry-sp2-11     61 .....
Bry-sp2-12     61 .....
Bry-sp1-10     61 .....
Bry-sp1-2      61 .....
Bry-sp1-1      61 .....
Bry-sp2-9      61 .....
Bry-sp2-5      61 .....T.....T.....
consensus      61 *****.*****.*****.*****.*****

Bry-sp1-3      121 ATTATTCATGTACCAGTACATATTATTCATGTACCAGTACATATTATTCATGTACTAGTA
Bry-sp2-14     121 .....T.....T.....
Bry-sp1-8      121 .C.....T.....C.....T.....C.....
Bry-sp2-11     121 .....T.....T.....
Bry-sp2-12     121 .....T.....T.....
Bry-sp1-10     121 .....T.....T.....
Bry-sp1-2      121 .....T.....T.....
Bry-sp1-1      121 .....T.....T.....
Bry-sp2-9      121 .....T.....T.....
Bry-sp2-5      121 .....TT.....TT.....
consensus      121 *.*****.*****.*****.*****.*****

Bry-sp1-3      181 CATATTATTCATGTACTAGTACATATTATTCATGTACTAGTACATATTATTCATGTACTA
Bry-sp2-14     181 .....
Bry-sp1-8      181 ...C.....A.....
Bry-sp2-11     181 .....
Bry-sp2-12     181 .....
Bry-sp1-10     181 .....
Bry-sp1-2      181 .....
Bry-sp1-1      181 .....
Bry-sp2-9      181 .....
Bry-sp2-5      181 .....
consensus      181 ****.*****.*****.*****.*****

Bry-sp1-3      241 GTACATATTATTCATGTACTAGTACATACACATCCACATCAAAGATCAGGAAA
Bry-sp2-14     241 .....
Bry-sp1-8      241 .....
Bry-sp2-11     241 .....
Bry-sp2-12     241 .....
Bry-sp1-10     241 .....
Bry-sp1-2      241 .....
Bry-sp1-1      241 .....
Bry-sp2-9      241 .....
Bry-sp2-5      241 .....C.....
consensus      241 *****.*****.*****.*****

Bry-sp1-3      301 ACTACCATATCTAAAAGGCCATAACAT-GAATGGTTTATAACAATCTTCCAATAAACA
Bry-sp2-14     301 .....-.....
Bry-sp1-8      301 .....-.....
Bry-sp2-11     301 .....-.....
Bry-sp2-12     301 .....-.....
Bry-sp1-10     301 .....-.....
Bry-sp1-2      301 .....C.....T.....T.....
Bry-sp1-1      301 .....-.....
Bry-sp2-9      301 .....C.....-.....
Bry-sp2-5      301 .....-.....T.....
consensus      301 *****.*****.*****.*****

```

```

Bry-sp1-3      360 ATGAACATTAAGAAGACATACAA-AATAGAAGTGAGAGACCACCAACACGTTTGTGTAAA
Bry-sp2-14    360 .....T.....
Bry-sp1-8      360 .....-.....
Bry-sp2-11    360 .....-.....
Bry-sp2-12    360 .....-.....
Bry-sp1-10    360 .....-.....
Bry-sp1-2     361 .....-.....
Bry-sp1-1     360 .....-.....
Bry-sp2-9     360 .....-.....
Bry-sp2-5     360 .....-.....
consensus     361 *****.*****

```

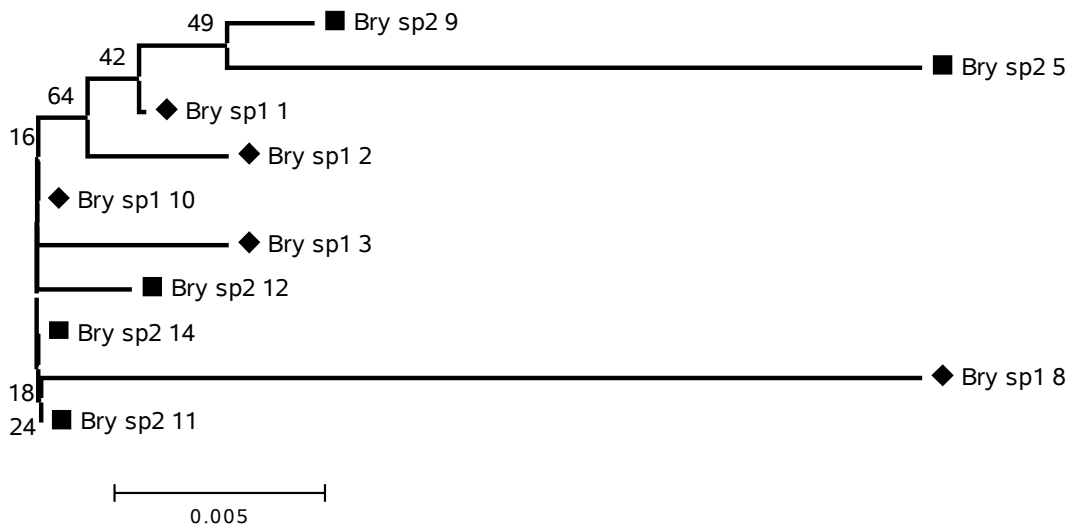
  

```

Bry-sp1-3      419 TGTACACCATTCTGAAAGGTCAAGGACAA
Bry-sp2-14    420 .....
Bry-sp1-8      419 .....
Bry-sp2-11    419 .....
Bry-sp2-12    419 .....
Bry-sp1-10    419 .....
Bry-sp1-2     420 .....
Bry-sp1-1     419 .....
Bry-sp2-9     419 .....
Bry-sp2-5     419 .....
consensus     421 *****

```

**Figura 6.** Alinhamento múltiplo em ClustalW de seqüências nucleotídicas da região hipervariável do *D-loop* de espécimes de *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2.



**Figura 7.** Dendrograma neighbor-joining construído a partir da matriz de distâncias de Tamura e Nei entre seqüências *D-loop* dos morfótipos *Brycon* sp1(♦) e *Brycon* sp2 (■).



## DISCUSSÃO

Os marcadores moleculares ISSR têm sido utilizados em várias áreas de estudos genéticos, sendo demonstrado o seu emprego em análises intrapopulacionais (Schulz *et al.*, 2004) e interpopulacionais de peixes (Fernandes-Matioli *et al.*, 2000). Além disso, a técnica ISSR apresenta algumas vantagens em relação a outras técnicas, como a RAPD, por exemplo, pois possui maior reprodutibilidade, tendo resultados semelhantes com variações grandes nas condições de amplificação (Matioli & Passos-Bueno, 2001).

Os dados obtidos pelos marcadores moleculares ISSR demonstraram que há alta similaridade entre os morfótipos de *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2. O polimorfismo encontrado não caracteriza espécies diferentes. Resultados semelhantes foram obtidos pela análise dos NTSs. Os tamanhos dos fragmentos obtidos estão dentro do padrão que é encontrado para outras espécies de peixes do gênero *Brycon* (Wasko *et al.*, 2001). Os dados gerados pela análise da região controle do DNAm<sub>t</sub> corroborou aqueles encontrados pelos marcadores nucleares. A porcentagem de polimorfismo detectado nas seqüências do *D-loop* foi baixa (cerca de 5%) e está dentro do limite que é encontrado para populações de uma mesma espécie (Prioli *et al.*, 2002, Martins *et al.*, 2003).

Os morfótipos *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2 diferem entre si apenas em relação à coloração da nadadeira anal, o que é confirmado pela presença de indivíduos intermediários. No entanto, de acordo com os resultados obtidos, este polimorfismo deve ser apenas intraespecífico, sendo os morfótipos pertencentes a uma única espécie, que estaria inserida dentro de *Brycon cf. pesu*.

As bacias hidrográficas da região neotropical possuem a maior biodiversidade de peixes do mundo. É também caracterizada pela grande diversidade de habitats, a qual possui espécies adaptadas em explorar cada tipo de ambiente. No entanto, ao longo do processo evolutivo novas adaptações podem surgir, através de mutações no material genético. Aquelas que oferecerem vantagens aos indivíduos são selecionadas e, através da reprodução, são repassadas para as gerações seguintes. Em populações de peixes de uma mesma espécie, diferenças morfológicas podem aparecer, gerando dúvidas em relação à taxonomia. Neste caso, análises baseadas

apenas em caracteres morfológicos podem não ser suficientes para dizer se elas são espécies diferentes (Oliveira, 2005; Lopes *et al.*, 2006). Com o uso de marcadores moleculares, resultados mais consistentes podem ser obtidos, o que permite conclusões mais precisas.

A variabilidade morfológica em peixes pode surgir em várias partes do corpo como resposta a diversos fatores, tais como adaptações bucais relacionadas a hábitos alimentares (Oliveira, 2005; Ruehl & DeWitt, 2005), variações na nadadeira caudal em função do fluxo de água (Imre *et al.*, 2002), tendo também efeitos na performance e comportamento da natação e atividades locomotoras (Plaut, 2000). Em adição, variações podem surgir em função de isolamento reprodutivo (Pakkasmaa & Piironen, 2001; Sell & Spirkovski, 2004; van Herwerden & Doherty, 2006), principalmente devido a barreiras geográficas. De acordo com os dados obtidos, tem ocorrido fluxo gênico entre os morfótipos *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2, pois não foi encontrado um padrão genético que fosse exclusivo de apenas um grupo. Sendo assim, não há evidências da ocorrência de isolamento reprodutivo.

Além das adaptações morfológicas para explorar diferentes habitats e alimentos, algumas espécies de peixes possuem caracteres morfológicos distintos relacionados à reprodução. Este polimorfismo, conhecido como dimorfismo sexual, ocorre principalmente nos machos. Estes podem apresentar-se distintos das fêmeas em relação ao tamanho do corpo, coloração e morfologia das nadadeiras (Kobelkowsky, 2004; Giacomello & Rasotto, 2005; Casatti *et al.*, 2006).

Algumas colorações de peixes são dependentes de pigmentos, como os carotenóides. Estes não são sintetizados pelo animal, mas obtidos na dieta. Sendo assim, colorações baseadas em carotenóides podem ser indicadores da habilidade de forrageamento e saúde de determinadas espécies de peixes. Além disso, estão também relacionadas com a escolha dos machos pelas fêmeas durante o acasalamento (Evans & Norris, 1996; Grether, 2000; Grether *et al.*, 2001) e parecem ser afetadas pela infecção de parasitas (Houde & Torio, 1992). No caso dos morfótipos *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2, não foi encontrado evidências de que a coloração da nadadeira anal estaria relacionada ao dimorfismo sexual, já que tanto os machos como as fêmeas possuem as duas variações de cor na nadadeira anal. Além disso, essas características foram observadas mesmo fora do período reprodutivo, pois capturas dos morfótipos

apresentando os dois tipos de nadadeiras foram realizados durante um ano inteiro.

Fuller & Travis (2004) estudaram a expressão da cor da nadadeira anal do peixe de água doce *Lucania goodei* (Atheriniformes, Cyprinodontidae), que possui populações na Flórida peninsular, sudeste da Geórgia e Carolina do Sul. Os machos desta espécie possuem um polimorfismo na coloração da nadadeira anal, apresentando as cores amarelo, vermelho e azul, com a presença de intermediários. Em experimentos conduzidos em laboratório, os autores chegaram à conclusão de que a variação de cores é afetada pela genética, pelo ambiente e por uma interação entre os dois fatores. O ambiente influencia através das condições de luminosidade, ou seja, os comprimentos de onda que atingem as diferentes profundidades da água. Por exemplo, machos com nadadeiras anais azuis são mais abundantes em águas com baixa transmissão de comprimentos de onda UV e azul. Por outro lado, machos com nadadeiras anais vermelhas são mais abundantes em populações com alta transmissão de comprimentos de onda UV e azul. Apesar de o polimorfismo ocorrer apenas nos machos, foi encontrada sua relação com um locus autossômico. No entanto, em alguns casos, o padrão de colorido dos machos pode ser resultado de herança restrita ao sexo (Houde, 1992), o que explicaria sua ausência nas fêmeas. A coloração avermelhada da nadadeira anal encontrada no morfótipo *Brycon* sp2 e ausente em *Brycon* sp1 poderia ser explicada por condições ambientais, tais como a luminosidade, que neste caso afetaria tanto a morfologia de machos como de fêmeas. No entanto, para comprovar esta hipótese seria necessário a condução de experimentos controlados em laboratório, com simulações do que ocorre no ambiente natural.

Determinar o grau pela qual a variação em caracteres morfológicos é controlada pela genética ou pelo ambiente é fundamental para o entendimento da adaptação. Os resultados obtidos com os marcadores moleculares nucleares e mitocondrial utilizados neste trabalho, não forneceram evidências de que a coloração da nadadeira anal dos morfótipos *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2 tenha base genética. No entanto, fatores ambientais podem estar influenciando na expressão de tal polimorfismo. Devido à alta similaridade genética observada entre os morfótipos *Brycon* sp1 e *Brycon* sp2, sugere-se que eles sejam identificados como uma única espécie, inserida em *Brycon* cf. *pesu*. Além disso, estudos adicionais devem ser realizados para verificar os fatores

que afetam a coloração da nadadeira anal, e se esta característica morfológica confere alguma vantagem aos indivíduos que a possuem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboim, M.A., Menezes, G.M., Schlitt, T. & Rogers, A.D. (2005). Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. *Molecular Ecology* **14** (5), 1343-1354.

Albert, J.S, Fernandes-Matioli, F.M.C. & Almeida-Toledo, L.F. (1999). New species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) from Southeastern Brazil: towards the deconstruction of *Gymnotus carapo*. *Copeia* **1999** (2), 410-421.

Avise, J.C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2<sup>nd</sup> Edition. Sinauer Associates Inc. 684p.

Casatti, L., Carvalho, F.R., Veronezi, J.L. & Lacerda, D.R. (2006). Reproductive biology of the neotropical superfetaceous *Pamphorichthys hollandi* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **17** (1), 59-64.

Cronin, M.A., Spearman, W.J., Wilmot, R.L., Patton, J.C. & Bickham, J.W. (1993). Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of Polymerase Chain Reaction (PCR) products. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**, 708-715.

Evans, M.R. & Norris, K. (1996). The importance of carotenoids in signaling during aggressive interactions between male firemouth cichlids (*Cichlasoma meeki*). *Behavioral Ecology* **7** (1), 1-6.

Fernandes-Matioli, F.M.C., Matioli, S.R. & Almeida-Toledo, L.F. (2000). Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)<sub>n</sub> microsatellite analysis. *Genetics and Molecular Biology* **23** (4), 803-807.

Feulner, P.G.D., Kirschbaum, F., Schugardt, C., Ketmaier, V. & Tiedemann, R. (2006). Electrophysiological and molecular genetic evidence for sympatrically occurring cryptic species in African weakly electric fishes (Teleostei:

Mormyridae: *Campylomormyrus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39**, 198-206.

Fuller, R.C. & Travis, J. (2004). Genetics, lighting environment, and heritable responses to lighting environment affect male color morph expression in bluefin killifish, *Lucania goodei*. *Evolution* **58** (5), 1086-1098.

Giacomello, E. & Rasotto, M.B. (2005). Sexual dimorphism and male mating success in the tentacled blenny, *Parablennius tentacularis* (Teleostei: Blenniidae). *Marine Biology* **147** (5), 1221-1228.

Grether, G.F. (2000). Carotenoid limitation and mate preference evolution: a test of the indicator hypothesis in guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution* **54** (5), 1712-1724.

Grether, G.F.; Hudon, J. & Endler, J.A. (2001). Carotenoid scarcity, synthetic pteridine pigments and the evolution of sexual coloration in guppies (*Poecilia reticulata*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268** (1473), 1245-1253.

Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J. & Owen, J.L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* **89**, 998-1006.

Houde, A.E. (1992). Sex-linked heritability of a sexually selected character in a natural-population of *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) (guppies). *Heredity* **69**, 229-235.

Houde, A.E. & Torio, A.J. (1992). Effect of parasitic infection on male color pattern and female choice in guppies. *Behavioral Ecology* **3** (4), 346-351.

Huff, S.W., Campbell, D., Gustafson, D.L., Lydeard, C., Altaba, C.R. & Giribet, G. (2004). Investigations into the phylogenetic relationships of the freshwater pear mussels (Bivalvia: Margaritiferidae) based on molecular data: Implications for their taxonomy and biogeography. *Journal of Molluscan Studies* **70**: 379-388.

Imre, I., McLaughlin, R.L. & Noakes, D.L.G. (2002). Phenotypic plasticity in brook charr: changes in caudal fin induced by water flow. *Journal of Fish Biology* **61** (5), 1171-1181.

- Kang, T.W., Lee, E.H., Kim, M.S., Paik, S.G., Kim, S. & Kim C.B. (2005). Molecular phylogeny and geography of Korean medaka fish (*Oryzias latipes*). *Molecules and Cells* **20** (1), 151-156.
- Kobelkowsky, A. (2004). Sexual dimorphism of the flounder *Bothus robinsi* (Pisces: Bothidae). *Journal of Morphology* **260** (2), 165-171.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150-163.
- Lavoue, S. & Sullivan, J.P. (2004). Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33** (1), 171-185.
- Lima, F.C.T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). (2003). In: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. (Reis R.E., Kullander S.O. & Ferraris Jr. C.J., ed.), pp. 174-181. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Lima, D., Freitas, J.E.P., Araujo, M.E. & Sole-Cava, A.M. (2005). Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **320** (2), 211-223.
- Lopes, M., Murta, A.G. & Cabral, H.N. (2006). Discrimination of spinefish *Macroramphosus* species and boarfish *Capros aper* morphotypes through multivariate analysis of body shape. *Helgoland Marine Research* **60** (1), 18-24.
- Martins, C. & Galleti Jr., P.M. (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome* **44**, 903-910.
- Martins, C., Wasko, A.P., Oliveira, C. & Foresti, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. (2003). *Genetics and Molecular Biology* **26** (1), 33-38.
- Matioli, S.R. & Passos-Bueno, M.R.S. (2001). Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In *Biologia molecular e evolução* (Matioli S.R., ed.), pp. 153-161. Ribeirão Preto: Holos.

Meyer, A., Kocher, T.D., Basasibwaki P. & Wilson, A.C. (1990). Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* **347** (6293): 550-553.

Monesi, N., Jacobs-Lorena, M. & Paço-Larson, M.L. (1998). The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **107** (8), 559-569.

Oliveira, C.A.M. (2005). Sobre a validade do gênero *Psalidodon* Eigenmann, 1911 (Characiformes, Characidae), na bacia do rio Iguaçu. Monografia de graduação, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil.

Pakkasmaa, S. & Piironen, J. (2001). Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society* **72** (2), 231-239.

Planquette, P., Keith, P. & Le Bail, P.-Y. (1996). Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome 1). Collection du Patrimoine Naturel, vol.22. IEGB-M.N.H.N., INRA, CSP, Min. Env., Paris. 429 p. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em : 27 oct. 2006.

Plaut, I. (2000). Effects of fin size on swimming performance, swimming behaviour and routine activity of zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Experimental Biology* **203** (4), 813-820.

Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J., Julio Jr, H.F., Pavanelli, C.S., Oliveira, A.V., Carrer, H., Carraro, D.M. & Prioli, L.M. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* **25** (4), 421-430.

Robles, F., de la Herrán, R., Ludwig, A., Rejón, C.R., Rejón, M.R. & Garrido-Ramos, M.A. (2005). Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in the ancient fish sturgeon. *Genome* **48**, 18-28.

Ruehl, C.B. & DeWitt, T.J. (2005). Trophic plasticity and fine grained resource variation in populations of western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Evolutionary Ecology Research* **7**(6), 801-819.

Sandoval-Castillo, J., Rocha-Olivares, A., Villavicencio-Garayzar, C. & Balart, E. (2004). Cryptic isolation of Gulf of Califórnia shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Marine Biology* **145** (5): 983-988.

Schulz, H.K., Smietana, P. & Schulz, R. (2004). Assessment of DNA variations of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in Germany and Poland using inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **372-73**, 387-399.

Sell, J. & Spirkovski, Z. (2004). Mitochondrial DNA differentiation between two forms of trout *Salmo letnica*, endemic to the Balkan Lake Ohrid, reflects their reproductive isolation. *Molecular Ecology* **13** (12), 3633-3644.

Sofia, S.H., Silva, C.R.M., Galindo, B.A., Almeida, F.S., Sodr , L.M.K., Martinez, C.B.R. (2006). Population genetic structure of *Astyanax scabripinis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia* **553**, 245-254.

Theodorakis, C.W., Lee, K.L., Adams, S.M. & Law, C.B. (2006). Evidence of altered gene flow, mutation rate, and genetic diversity in redbreast sunfish from a pulp-mill-contaminated river. *Environmental Science & Technology* **40** (1): 377-386.

van Herwerden, L. & Doherty, P.J. (2006). Contrasting genetic structures across two hybrid zones of a tropical reef fish, *Acanthochromis polyacanthus* (Bleeker 1855). *J. Evol. Biol.* **19** (1), 239-252.

Wasko, A.P., Martins, C., Wright, J.M. & Galetti Jr., PM. (2001). Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* **44**, 893-902.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)