

ANA LUISA MONEZI LUCENA

**DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO GÊNERO
NEOPLECOSTOMUS (TELEOSTEI: LORICARIIDAE) DA BACIA DO ALTO RIO
PARANÁ**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANA LUISA MONEZI LUCENA

**DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO GÊNERO
NEOPLECOSTOMUS (TELEOSTEI: LORICARIIDAE) DA BACIA DO ALTO RIO
PARANÁ**

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

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

L935d Lucena, Ana Luisa Monezi, 1982-
Diferenciação genética de populações do gênero
Neoplecostomus (Teleostei: Loricariidae) da bacia do
alto rio Paraná - Brasil / Ana Luisa Monezi Lucena. --
Maringá, 2010.
xi, 49 f. : il., figs. (algumas color.)

Orientador : Prof. Dr. Erasmo Renesto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Pós-graduação em Genética e Melhoramento, 2010.

1. *Neoplecostomus* - Variabilidade genética - Alto rio
Paraná - Brasil. 2. Isoenzimas - Eletroforese -
Neoplecostomus corumba. I. Renesto, Erasmo, orient. II.
Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 22.ed. 576.58

Dedico à minha tia Cleuza e à Professora Dolores, pessoas estas que me mostraram a importância do pensamento crítico e da aprendizagem e que, sem dúvida, foram indispensáveis em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas e por mais esta oportunidade.

À Universidade Estadual de Maringá, pela estrutura oferecida para elaboração da pesquisa e pelos excelentes professores que contribuíram para o meu crescimento e formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e a todos os professores deste programa que contribuírem diretamente na minha formação profissional.

Ao CNPq pelo auxílio em forma de bolsa de estudo.

Ao professor doutor Erasmo Renesto, pela orientação competente, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade e confiança essenciais nesta etapa.

Ao professor doutor Cláudio Henrique Zawadzki, pela sua extraordinária ajuda no enriquecimento desta dissertação, pelas suas expedições e coletas realizadas, na qual permitiram que este trabalho fosse realizado.

Aos docentes que auxiliaram na minha caminhada até aqui, em especial às professoras Ana Silvia Lapenta, Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, José Ricardo Penteado, Claudete Aparecida Mangolin, Maria de Fátima Pires da Silva Machado, Sandra Aparecida Oliveira Collet, pela atenção e auxílio.

Aos amigos, colegas e funcionário de laboratório: Ana Flávia, Ana Lúcia, Andreyra, Denise Fábio, Ivone, Juliana Franzone, Juliana Sala, Liriana, Michele, Tiara, Sérgio, Leila e Rosinete pelo companheirismo e troca de favores e aprendizado.

Aos amigos, Suzana e Flávio, pelo incentivo e ajuda na execução na prática deste trabalho.

Aos meus pais, Maria Josefina e Hermes, aos meus irmãos, Guilherme, Frederico e Rodrigo pelo incentivo, apoio, carinho, confiança e amizade.

Ao meu namorado Sérgio, pelo incentivo, compreensão e paciência nos momentos de ausência.

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

BIOGRAFIA

Ana Luisa Monezi Lucena, filha de Hermes Lucena e Maria Josefina Monezi, nascida no dia 15 de dezembro de 1982 na cidade de Maringá, Estado do Paraná.

No ano de 1989, iniciou o Ensino Fundamental na Escola Estadual Professor Francisco José Perioto, finalizando-o no ano de 1996. O Ensino Médio cursou, no Colégio Estadual Oberon Floriano Dittert, no período compreendido entre 1997 e 1999.

Concluiu Licenciatura em Ciências Biológicas, no ano de 2007, na Universidade Estadual de Maringá. Durante o Curso de Graduação, participou de três projetos de Iniciação Científica ligados à resistência genética de insetos de grão armazenados, além de outros projetos de pesquisa.

Em 2008, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, com a linha de pesquisa Variabilidade Genética de Populações Naturais de Peixes, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Genética Animal.

RESUMO

LUCENA, Ana Luisa Monezi. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2010. **Diferenciação genética de populações do gênero *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) da bacia do Alto Rio Paraná.** Professor orientador: Erasmo Renesto.

A Ictiofauna Neotropical de água doce compreende uma rica diversidade de peixes. Os estudos taxonômicos, econômicos e ecológicos são necessários para identificação e conservação de *Neoplecostomus* e demais espécies desta ictiofauna. Este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética de oito populações do gênero *Neoplecostomus*, de status taxonômico, ainda não definido e comparar com uma espécie já descrita, como *Neoplecostomus corumba*. Para isso, utilizou-se da técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de amido para a análise de seis sistemas enzimáticos (G3PDH, GPI, LDH, IDH, MDH e PGM). Foram detectados 10 *loci* enzimáticos e 24 alelos, sendo que, quatro alelos foram exclusivos, dois presentes na população de Cachoeira (*Gpi-B(b)* e *Idh(b)*) e os demais nas populações de Taquari (*Gpi-A (e)*) e na de Espraiado (*Gpi-A (a)*). Todas as populações apresentaram *loci* polimórficos, com exceção da população de Casca D'Antas. O número médio de alelos por *locus* variou entre 1,8-1,0. O valor médio do índice F_{IS} (0, 5621) e de F_{IT} (0, 8716) demonstraram excesso de homozigotos e o valor de $F_{ST} = 0,7067$ indicou que as populações são geneticamente diferenciadas uma das outras. As identidades e as distâncias genéticas de Nei calculadas demonstraram que algumas são um tanto diferentes, podendo ser consideradas espécies distintas. O dendograma de UPGMA construído demonstrou que as populações ficaram agrupadas em três conjuntos: Cachoeira+*N. corumba*+Espraiado, Piranguçu+Jaguari+Monjolinho+Casca D'Antas, e Carandaí+Tamborete. Concluímos, portanto, que os métodos utilizados foram eficazes para diferenciação das populações, refletindo um forte indicativo da presença de, pelo menos, duas espécies diferentes de *Neoplecostomus corumba* dentre as regiões analisadas do alto da bacia do rio Paraná.

Palavras-chave: Aloenzimas, heterozigosidade, variabilidade genética.

ABSTRACT

LUCENA, Ana Luisa Monezi, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, February 2010. **Genetic differentiation in populations of *Neoplecostomus* genus (Teleostei: Loricariidae) from the upper Paraná River.** Adviser: Erasmo Renesto.

The Neotropical freshwater ichthyofauna comprises a rich diversity of fish. The taxonomic, ecological and economical are needed for identification and conservation of this species *Neoplecostomus* and other fish species. This study aimed to analyze the genetic variability of eight populations of the genus *Neoplecostomus* of taxonomic status is not defined and compared with a population of species already described as *Neoplecostomus corumba*. For this we used the technique of isoenzyme electrophoresis in starch gel for the analysis of six (G3pdh, GPI, LDH, IDH, MDH and PGM) enzyme systems. Were observed in 10 *loci* and 24 alleles, four alleles were unique, two present in the population of Cachoeira (Gpi-B (b) and Idh (b)) and other populations of Taquari (Gpi-A (e)) and of Espiraiado (Gpi-A (a)). All populations showed polymorphic loci, except the population of Casca D'Antas. The average number of alleles per locus to ranged from 1.8-1.0. The average of the index F_{IS} (0.5621) and F_{IT} (0.8716) indicated the homozygote excess and the value of $F_{ST} = 0.7067$ indicated that the populations are genetically too different from each other. Nei's Genetic Identities and genetic distances estimated demonstrate that some of them are enough different to be considered distinct species. UPGMA dendrogram demonstrated that the populations are grouped into three sets, Cachoeira+*N. corumba*+Espiraiado, Piranguçu+Jaguari+Monjolinho+Casca D'Antas, and Carandaí+Tamborete. We conclude that the methods used were effective for differentiation of populations reflecting a strong indication of the presence of at least two different *Neoplecostomus corumba* among the regions analyzed the upper of the Paraná River basin.

Key words: alozyme, heterozygosis, genetic variability.

ÍNDICE

ABSTRACT	VII
ÍNDICE	1
LISTA DE QUADROS	2
LISTA DE FIGURAS	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. Ordem Siluriformes	7
2.2. Superfamília Loricarioidea.....	8
2.3. Subfamília Neoplecostominae - Gênero <i>Neoplecostomus</i>	9
2.4. Eletroforese de Isoenzimas.....	13
2.5. Variabilidade genética de populações naturais em pesquisas utilizando a técnica de eletroforese de isoenzimas e outras técnicas adicionais.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Coleta e Armazenagem	21
3.2. Eletroforese em gel de amido.....	23
3.3. Análises das Isoenzimas.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Caracterização da coleta, locais da coleta, Bacia Hidrográfica, Municípios próximos, Coordenadas Geográficas e número de indivíduos analisados em cada população (Pop 1: Cachoeira; Pop 2: *Neoplecostomus corumba*; Pop 3: Carandaí; Pop 4: Tamborete; Pop 5: Espraiado; Pop 6: Piranguçu; Pop 7: Monjolinho; Pop 8: Casca D'Antas e Pop 9: Jaguari)23
- Quadro 2 - Nome, número de Comissão de Enzima (n° E.C.) e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido25
- Quadro 3 - Estimativas de freqüências alélicas das populações de *Neoplecostomus*. (P1: Cachoeira; P 2: *N.corumba*; P3: Carandaí; P 4: Tamborete; P 5: Espraiado; P 6: Piranguçu; P 7: Monjolinho; P 8: Casca D'antas e P 9 : Jaguari. Valores em negrito indicam alelos exclusivos. N°: número de indivíduos analisados)26
- Quadro 4. Heterozigosidade esperada e observada (H_o e H_e); percentagem de *loci* polimórficos (P) e número de alelos por *loci* (K). Entre parênteses esta o desvio padrão.....31
- Quadro 5 - Estatística de Wright para as oito populações de *Neoplecostomus* e *N. corumba* coletada no Alto da bacia do rio Paraná. T = tamanho da amostra33
- Quadro 6 - Valores de identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1972), entre as nove populações de *Neoplecostomus*. (1 = Cachoeira; 2 = *N.corumba*; 3 = Carandaí; 4 = Tamborete; 5 = Espraiado; 6 = Piranguçu; 7 = Monjolinho; 8 = Casca D'antas; 9 = Jaguari)35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa geográfico da bacia do rio Paraná, mostrando as localidades dos 9 exemplares analisados. Pop 1: Cachoeira; Pop 2: *Neoplecostomus corumba*; Pop 3: Carandaí; Pop 4: Tamborete; Pop 5: Espraiado; Pop 6: Piranguçu; Pop 7: Monjolinho; Pop 8: Casca D'Antas e Pop 9: Jaguari.22
- Figura 2 - Exemplares de *Neoplecostomus* coletado nos diferentes afluentes do Alto do rio Paraná: a: Cachoeira, b: *Neoplecostomus corumba*, c: Carandaí, d: Tamborete, e: Espraiado, f: Piranguçu, g: Monjolinho, h: Casca D'Antas, i: Jaguari.....22
- Figura 3 - Zimograma dos sistemas enzimáticos analisados em gel de amido, com os seus respectivos alelos, presentes nas populações (1= Cachoeira; 2= *N. corumba*; 3= Carandaí; 4= Tamborete; 5= Espraiado; 6= Piranguçu; 7= Monjolinho; 8= Casca D'Antas; 9= Jaguari).28
- Figura 4 - Dendograma de UPGMA calculado a partir da distância genética de Nei (1978) entre as oito populações e *N. corumba*. Clados 1, 2 e 3.38

1. INTRODUÇÃO

O estudo das relações evolutivas entre os organismos é de grande importância para diversas áreas da Biologia, diferenciando apenas nos objetivos de cada pesquisador. A história evolutiva dos organismos está associada às mudanças climáticas, geográficas, mutações, recombinações e fluxo gênico ocorridas durante a história do planeta. As análises da variabilidade genética de populações naturais, que estão diretamente relacionadas a estas mudanças, permitem não só a elucidação de estudos de sua evolução, como também constitui a base para estudos biogeográficos, ecológicos e ainda auxiliam na identificação de novas espécies (Futuyma, 1992).

Pesquisas voltadas ao conhecimento da diversidade biológica são o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida e ao reconhecimento de espécies, bem como a habilidade de nomeá-las é fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e todas as outras disciplinas relacionadas aos organismos (Savage, 1995). A associação de informações morfológicas e análises genéticas têm adicionado dados importantes na investigação deste estudo.

Crescentes estudos têm sido voltados à diversidade da ictiofauna Neotropical de água doce, em especial por esta ser rica em formas, tamanhos e habitat. Segundo um levantamento feito por Reis et al. (2003), reconhecem-se 71 famílias e 4.475 espécies válidas de peixes de água doce nas Américas do Sul e Central. Além disso, estes autores estimam a existência de 6.000 espécies nos rios e lagos da região Neotropical, sendo que a estimativa disponível sobre a quantidade de peixes de água doce para todo o planeta é da ordem de 13.000 espécies.

A família Loricariidae possui representantes com ampla distribuição e diversidade de peixes neotropicais de água doce (Chiachio et al., 2008). O gênero *Neoplecostomus*, pertencente a esta família e a ordem Siluriformes foi reconhecida por Regan (1904) como um grupo pertencente à subfamília Neoplecostominae. *Neoplecostomus* compreende espécies de tamanho pequeno (menos 15 cm) e seus representantes no Brasil são encontrados no sul e sudeste, em pequenos riachos de

águas claras e rasas, correntezas fortes a moderadas, e fundos com pedregulhos e, às vezes, areias (Langeani, 1990; Pereira e Reis, 2002; Pereira e Oyakawa, 2003).

O gênero *Neoplecostomus* foi revisado por Langeani (1990) que citou duas espécies reconhecidas como: *N. granosus* (Valenciennes, 1840), de Cayenne (Guyana Francesa) e no Rio de Janeiro o *N. microps* (Steindachner, 1876), a espécie tipo do gênero, da bacia do rio Paraíba do Sul. Langeani (1990) também descreveu quatro novas espécies: *N. espiritosantensis*, dos rios costeiros do Estado do Espírito Santo; *N. franciscoensis*, dos rios de cabeceira da bacia do rio São Francisco; *N. paranensis*, dos riachos de cabeceira da bacia do alto rio Paraná (*sensu* Britski e Langeani, 1988); e *N. ribeirensis*, da bacia do rio Ribeira de Iguape. Cinco anos mais tarde, Bizerril et al. (1995) descreveram uma espécie adicional, *N. variipictus* da bacia do rio Paraíba do Sul. Recentemente Zawadzki et al. (2008), acrescentaram três novas espécies a este gênero (*N. Corumba*; *N. Solenae* e *N. yapo*) localizadas no alto da bacia do rio Paraná, na qual foram diferenciadas das congêneres por caracteres morfométricos e merísticos, além do padrão de colorido e a presença de nadadeiras adiposas bem desenvolvidas.

Durante o século XIX e início do século XX, a definição morfológica de espécie dominou a taxonomia animal (Mayr, 1977), em que basicamente as diferenças morfológicas eram usadas como critério para a determinação de uma espécie. Para Mayr (1963) e Dobzhansky et al. (1977), em organismos que apresentam reprodução sexuada, espécies são “grupos de populações naturais real ou potencialmente intercruzantes que são reprodutivamente isolados de outros grupos semelhantes”. Este isolamento reprodutivo seria uma adaptação para proteger os genes já bem integrados e co-adaptados da espécie.

Atualmente, vários conceitos de espécie se somam. Na literatura são citados no mínimo 26 significados. Alguns conceitos definem espécies num instante no tempo, enquanto outros procuram defini-las através do tempo geológico. Alguns apontam o processo de especiação, outros dirigem a atenção para o produto da especiação. O moderno significado de espécie tem sido indicado a partir da filogenética, na qual se define espécie como a soma de todos os indivíduos e de suas relações de parentesco desde sua origem, ou seja, considera-se que são entidades

transtemporais, abrangendo as seqüências de todos os momentos da espécie ao longo do tempo, desde sua origem. Assim a premissa implícita no conceito filogenético é que a classificação deve refletir a relação ramificada entre as espécies, a qual é indicada por cladogramas (Amorim, 2009)

A dificuldade na distinção de espécies, principalmente para aqueles que utilizam como principal método de diferenciação os morfológicos, podem não encontrar resultados satisfatórios, pois algumas vezes as espécies parecem ser morfológicamente muito similares, mas apresentam características genéticas distintas. Atualmente as análises genéticas tem trazido bons resultados na identificação, como pode ser observado nos trabalhos de Zawadzki et al. (2004a), no qual, utilizando a técnica de eletroforese de aloenzimas, comparou-se duas espécies de *Neoplecostomus*, uma *Neoplecostomus* sp. do rio Corumba, bacia do rio Paranaíba e a outra *N. paranensis* do riacho Hortelã, bacia do rio Paranapanema. Neste estudo eles detectaram que, apesar da semelhança morfológica geral, estas populações apresentaram distância genética significativas, como aquelas obtidas entre espécies de diferentes gêneros (Zawadzki et al., 2005). Utilizando esta mesma técnica Ito et al. (2009) conseguiram diferenciar dois morfótipos; *Hypostomus nigromaculatus* e *Hypostomus cf. nigromaculatus*, que morfológicamente eram muito similares, mas novamente distintos quanto às características genéticas. No entanto, estudos genéticos podem ser utilizados ainda para confirmar hipóteses de semelhanças, como observado no estudo de Philippsen et al. (2009), analisando quatro populações de *Neoplecostomus yapo* através da técnica de isoenzimas verificaram as semelhanças genéticas adjacente às análises morfológicas.

Interessar-se na identificação e na prática de conservação de espécies ainda não descritas, em especial do gênero de *Neoplecostomus*, objeto de nosso estudo, é corroborar com estudos sistemáticos, econômicos e ecológicos futuros. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de oito populações do gênero *Neoplecostomus* e comparar estas populações com a espécie *Neoplecostomus corumba*. Para isso, utilizou-se da técnica de eletroforese de isoenzimas para estimar o nível de variabilidade genética.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ordem Siluriformes

Siluriformes é a ordem mais diversificada e amplamente distribuída. Atualmente inclui cerca de 36 famílias, 478 gêneros e 3.093 espécies (Ferraris, 2007).

Os Siluriformes são popularmente conhecidos no Brasil como “bagres”, “cascudos”, “armados”, “mandis”, “jaús” ou “pintados”. Apresentam uma grande variedade de formas, com inúmeras adaptações anatômicas, fisiológicas e comportamentais, ocupando um amplo espectro de nichos e ambientes. Possuem hábitos predominantemente crepusculares e noturnos, o que os levam a habitarem, em geral, locais com águas turvas como o fundo dos rios e a permanecer entre rochas e a vegetação (Ferraris, 1998; 2007). São caracterizados principalmente por possuir ausência de escamas sobre o corpo, presença de barbilhões e freqüentemente acúleos fortes e pungentes à frente do primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitoral (Alexander, 1965; Paxton e Eschmyer, 1998). O corpo, desprovido de escamas, pode ser revestido por uma pele espessa ou ser coberto total ou parcialmente por placas ósseas. Os hábitos alimentares também são muito variados, com espécies herbívoras, planctófagos, carnívoros e onívoros.

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

Uma ampla diversidade ecológica e evolutiva observada nesta ordem a faz foco de muitos estudos (Burgess, 1989; Fink e Fink, 1981, 1996; Pinna, 1998;

Arratia et al., 2003; Britto, 2003), tais como os sistemáticos, taxonômicos e genéticos.

2.2. Superfamília Loricarioidea

A superfamília Loricarioidea é o maior grupo monofilético de Siluriformes da região neotropical (Pinna, 1998; Britto, 2003). Esta superfamília foi o primeiro grupo natural de famílias de Siluriformes reconhecido. Essa afinidade foi primeiramente proposta por Peyer (1922), com base na presença de odontódeos e na estrutura do primeiro raio da nadadeira peitoral. Além destes caracteres, Pinna (1998) identificou mais dois que corroboram o monofiletismo da superfamília: dentes mandibulares com cúspides bífidas e ramos anteriores do basipterígio sem cartilagem nos adultos. De acordo, com a análise de Britto (2003), a presença dos ossículos do aparelho de Weber encapsulados mostrou-se um caráter exclusivo para Loricarioidea.

A superfamília Loricarioidea é composta por seis famílias: Nematogenyidae (uma espécie), Trichomycteridae (201 espécies), Callichthyidae (177 espécies), Scoloplacidae (quatro espécies), Astroblepidae (54 espécies) e Loricariidae (684 espécies) (Pinna, 1998; Nelson, 2006). Dentro desse grupo estão os três maiores gêneros de Siluriformes: *Hypostomus*, *Corydoras* e *Trichomycterus*, além de um grande número de espécies de interesse econômico, principalmente como espécies ornamentais.

Os representantes da família loricariidae se caracterizam por apresentarem um corpo coberto por placas dérmicas e uma boca com uma ventosa circular. É a segunda maior família que apresenta uma grande diversidade e distribuição na fauna de peixes neotropicais de água doce, com atualmente 716 espécies reconhecidas (Ferraris, 2007; Chiachio et al., 2008).

Os loricariideos compreendem 96 gêneros e seis subfamílias, dentre estas seis subfamílias, a Neoplecostominae apresentam um número moderado de espécies (38 spp), Lithogeneinae (duas spp) e Delturinae (sete spp) enquanto as três subfamílias Hypoptopomatinae, Loricariinae e Hypostaminae apresentam uma rica distribuição (94 spp) (Reis et al., 2003; Ferraris, 2007)

2.3. Subfamília Neoplecostominae - gênero *Neoplecostomus*

Atualmente e por vários anos anteriores, têm sido demonstrados diversos estudos filogenéticos voltados às diferenças sobre as subfamílias de Loricarídeos. Diferentes autores relataram tais estudos, como em Eigenmann & Eigenmann (1890); Regan (1904); Eigenmann (1910); Gosline (1945, 1947); Boeseman (1971); Isbrücker (1980); Howes (1983); Schaefer (1987); Montoya-Burgos et al. (1998); Armbruster (2004); Chiachio et al. (2008); e Cramer et al. (2007). As principais diferenças entre as classificações propostas estão na forma ampla de apresentar Neoplecostominae, proposta por Gosline (1947) e a separação de Ancistrinae de Hypostominae (Isbrücker, 1980).

Até recentemente, *Neoplecostomus* era o único gênero de Neoplecostominae, um grupo originalmente proposto por Regan (1904) para uma única espécie (*N. granosus*). Regan (1904) também considerou Neoplecostominae como o grupo loricariideo mais proximamente aparentado a Astroblepidae (Ferraris, 2003).

Gosline (1945) promoveu a maior revisão da família, reconhecendo cerca de 400 Espécies. Nesse trabalho, Gosline reconheceu Neoplecostominae, como um único gênero, *Neoplecostomus*. Entretanto, em 1947, Gosline considerou Neoplecostominae como um grupo mais abrangente, incluindo 12 gêneros: *Neoplecostomus*, *Upsilonodus*, *Hemipsilichthys*, *Pareiorhaphis*, *Pareiorhina*, *Kronichthys*, *Corymbophanes*, *Delturus*, *Rhinelepis*, *Canthopomus* (= *Pseudorinelepis*), *Pogonopoma* e *Pogonopomoides*. No entanto, todos esses gêneros, com exceção de *Neoplecostomus*, já haviam sido previamente incluídos por Regan (1904) em Plecostominae (=Hypostominae). Essa proposição foi significativamente diferente das propostas de Regan (1904) quanto à designação da subfamília, e de Gosline (1945), pois ambos incluíram apenas o gênero *Neoplecostomus* como representante de Neoplecostominae.

Isbrücker (1980) contribuiu de forma significativa com os estudos sobre a classificação dos loricarídeos. Seu trabalho permitiu a descrição de muitas espécies novas e a resolução de determinadas situações relacionadas com sinónímias. Neste estudo, Idbrücker (1980) alterou novamente a composição de Neoplecostominae,

incluindo nesse táxon somente o gênero *Neoplecostomus*. Os outros 11 gêneros, anteriormente alocados em Neoplecostominae por Gosline (1947) foram considerados novamente como representantes de Hypostominae.

Howes (1983), em um estudo detalhado usando caracteres osteológicos e miológicos do crânio, foi o primeiro a aplicar a metodologia cladística na classificação de Loricariidae. Os resultados mostraram um arranjo divergente entre o cladograma e a taxonomia *sensu* Isbrücker (1980). Entre as diferenças encontradas, está a inclusão de *Hemipsilichthys* como membro de Chaetostominae (em 1947, Gosline havia incluído *Hemipsilichthys* em Neoplecostominae) e a condição de Hypostominae e Ancistrinae não formarem grupos monofiléticos.

Schaefer (1987) manteve a classificação de Isbrücker (1980) e promoveu uma análise filogenética envolvendo representantes de todas as subfamílias. Entretanto, dos 12 gêneros alocados em Neoplecostominae por Gosline em 1947, Schaefer examinou somente *Kronichthys*, *Corymbophanes*, *Pogonopomoides*, *Pseudorinelepis* e *Rhinelepis*, que foram considerados como membros de Hypostominae. Apenas *Neoplecostomus* foi considerado como representante de Neoplecostominae. Os resultados de Schaefer (1987) sugeriam que Neoplecostominae seria o grupo irmão de todos os demais loricarídeos, exceto Lithogeninae.

Montoya-Burgos et al. (1998) forneceram o primeiro estudo de filogenia molecular com ênfase nas subfamílias Hypostominae e Ancistrinae. A análise de Montoya-Burgos et al. foi baseada na seqüência parcial dos genes mitocondriais 12s e 16s obtidos de 58 espécies que incluiu representantes de cinco das seis subfamílias previamente incluídas em Loricariidae por Isbrücker (1980) e Schaefer (1987). Lithogeninae não foi incluído na análise. Os resultados obtidos foram parcialmente diferentes da classificação de Isbrücker (1980) e de Schaefer (1987). *Hemipsilichthys gobio* foi considerado pela primeira vez como membro basal entre os loricarídeos. Também um conceito mais abrangente de Neoplecostominae foi apresentado, com *Hemipsilichthys splendens*, *Hemipsilichthys* sp., *Isbrueckerichthys duseni*, *Kronichthys* e *Neoplecostomus* formando um clado monofilético. Em outro ramo, o gênero *Pareiorhina* se mostrou mais relacionado à

Pseudotocinclus tietensis. Adicionalmente, *Hemipsilichthys* foi considerado polifilético.

Armbruster (2004) apresentou outro estudo filogenético, no qual expandiu Neoplecostominae para abrigar *Hemipsilichthys* (exceto *H. gobio*), *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Neoplecostomus* e *Pareiorhina*, mesmo não sendo diagnosticado como grupo monofilético. Ao final da análise, os gêneros *Isbrueckerichthys* e *Pareiorhina* formaram um grupo monofilético com *Neoplecostomus*, enquanto *Kronichthys* e um táxon identificado como *Hemipsilichthys* formaram um grupo monofilético com Hypoptopomatinae. *Hemipsilichthys* foi considerado grupo-irmão dos demais Neoplecostominae e Hypoptopomatinae. Também *Delturus angulicauda* e *Hemipsilichthys gobio* (identificado como *Upsilonodus victori*) formaram um clado monofilético, grupo irmão de todos os demais loricarídeos, exceto *Lithogenes*.

Segundo Armbruster (2004), as relações entre os gêneros de Neoplecostominae e Hypoptopomatinae são duvidosas. No entanto, Armbruster (2004) afirmou que *Hemipsilichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Neoplecostomus* e *Pareiorhina* não podem ser incluídos em Hypostominae, mantendo estes em Neoplecostominae, até que uma análise envolvendo todos os gêneros incluídos em Neoplecostominae e Hypoptopomatinae fosse realizada.

Langeani (1990) revisou o gênero *Neoplecostomus* e reconheceu: *N. microps*, *N. granosus*, *N. paranensis*, *N. espiritosantensis*, *N. ribeirensis* e *N. franciscoensis*. Posteriormente, Bizerril (1995) descreveu *N. variipictus* e, recentemente, Zawadzki et al. (2008) descreveram três novas espécies para *Neoplecostomus*: *N. corumba*, *N. selanae* e *N. yapo*.

Atualmente, Chiachio et al. (2008) com intuito de ampliar informações moleculares da relação entre as subfamílias Hypoptopomatinae e Neoplecostominae, baseando em seqüências da região nuclear correspondente ao gene F-Reticulon-4, fizeram a análise de árvores filogenéticas, englobando os gêneros destas duas subfamílias. Neste estudo, Chiachio et al. (2008) demonstraram que Hypoptopomatinae é parafilético, uma vez que a subfamília Neoplecostominae aparece dentro de Hypoptopomatinae, formando grupo irmão com a tribo

Otothyriini. A tribo Hypoptopomatini aparece monofilético e irmão de Neoplecostominae mais Ototryriini. Neoplecostominae não parece monofilética devido à presença de *Pseudotocinclus tietensis*, como grupo irmão das espécies do gênero *Pareiorhina*. Todo o clado formado por Neoplecostominae mais *Pseudotocinclus tietensis* aparece como irmão da tribo Otothyriini, onde as relações internas entre gêneros e espécies não se alteram quando analisados sem a subfamília Neoplecostominae.

Cramer et al. (2007) usando dados de seqüências mitocondriais do citocromo c oxidase, demonstraram as relações filogenéticas das subfamílias Neoplecostominae e Hypoptopomatinae e seus resultados demonstraram um clado monofilético composto de Hypoptopomatinae + Neoplecostominae como irmão de Hypostaminae e este clado irmão de Loricariinae. Contudo, nem Hypoptopomatinae nem o Neoplecostominae são grupos monofiléticos. Assim Cramer et al. (2007) sugere que se faz necessário fazer novas análises com um maior número de amostras destas subfamílias e mais análises de seqüências de genes nucleares. Além disso, os gêneros *Pareiorhaphis*, *Hisonotus* e *Paratocinclus* revelaram polifilético.

Pesquisadores admitem que parte do problema dos gêneros considerados como membros de Neoplecostominae ainda persiste. Entretanto, considera-se que avanços nessa situação têm ocorrido desde as proposições de Montoya-Burgos et al. (1998), Armbruster et al. (2000), Armbruster (2004) e Reis et al. (2006). Entre os avanços, pode-se citar a posição ocupada pelos gêneros *Corymbophanes*, *Upsilonodus*, *Hemipsilichthys*, *Delturus*, *Pogonopoma*, *Rhinelepis*, *Pseudorinelepis* e *Pogonopomoides*, que hoje apresentam uma situação estável, sendo alocados em diferentes tribos e subfamílias, dentro de Loricariidae. (Pereira, 2008).

Os Neoplecostominae, no Brasil, estão distribuídos em duas áreas adjacentes na costa leste, incluindo a bacia do rio São Francisco e o alto da bacia do rio Paraná (Langeani, 1990; Chiachio et al., 2008). Desde então não se tem encontrado nenhuma espécie desta subfamília fora desta área. Segundo Montoya-Burgos (2003) e Chiachio et al. (2008), isso pode ser devido às barreiras de dispersão, competições interespecíficas com outros loricariidae, tamanho do corpo e custo energético ou características morfológicas e anatômicas.

2.4. Eletroforese de isoenzimas

A Biologia Molecular tem sido a ferramenta escolhida para os estudos de genética de populações e tem acumulado avanços importantes, como a geração de técnicas cada vez mais precisas para o exame de segmentos de DNA. Destaca-se, também, variados marcadores moleculares aplicáveis aos mais diversos problemas encontrados no estudo de populações, permitindo desde a estimativa do nível de variabilidade genética de uma dada população à construção de árvores filogenéticas, relacionando espécies próximas e elucidando questões de parentesco (Marques, 2002).

A eletroforese de enzimas é uma técnica genética bioquímica utilizada em diferentes áreas da genética e de melhoramento de organismos, refletindo resultados importantes para estimar a variabilidade genética.

A variabilidade genética detectada pela técnica de eletroforese de isoenzimas parte do princípio de que as proteínas são cadeias de aminoácidos que refletem a expressão de um gene ativo no DNA (Torres et al., 2004). Nesta técnica, ocorre a separação de moléculas em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações, em suportes porosos e tampões apropriados, sob a influência de um campo elétrico contínuo (Alfenas, 2006). Estes suportes porosos são os géis que funcionam como um meio por onde as isoenzimas precisam passar, podendo ser de amido hidrolisado (Smithies, 1955), acetato de celulose ou de poliacrilamida. Em seguida, as enzimas escolhidas ou outras proteínas são coradas por soluções específicas em métodos histoquímicos apropriados (Hunter e Markert, 1957; Shaw e Prasad, 1970; Harris e Hopkinson, 1976; Richardson et al., 1986).

Por meio da técnica de eletroforese, podemos supor quando ocorre substituição de um aminoácido numa molécula de proteína, a qual é detectada por razão da alteração de sua carga elétrica ou mudanças na sua conformação, que altera a sua taxa de migração. Algumas das mutações em regiões do DNA, que codifica uma determinada enzima, poderão expressar-se como moléculas de enzima, diferindo em sua mobilidade eletroforética (Shields et al., 1983; Thorpe e Solé-Cava, 1994). Pode ocorrer também a subestimativa da variabilidade genética, uma

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

As isoenzimas ou isozimas são definidas como formas múltiplas de uma mesma enzima, que ocorrem em um mesmo organismo com afinidade sobre um mesmo substrato. (Thorpe e Solé-Cava, 1994; Machado et al., 1999). São controladas geneticamente por alelos ou por genes situados em diferentes locos. No entanto, algumas isoenzimas são controladas por alelos de um só loco e são denominadas de aloenzimas. Elas podem ser produtos de processamentos diferenciais de uma mesma molécula de mRNA, ou de modificações do próprio polipeptídio após a sua transcrição (Machado et al., 1999).

Assim como as frações polipeptídicas e de proteínas totais, as isoenzimas representam os produtos primários dos genes, que passaram pelos processos de transcrição e tradução. Geneticamente, esta caracterização é mais refinada do que as caracterizações morfológicas, que geralmente são produtos de mais de um gene associado a mecanismos diferenciais de expressão e de regulação e a fatores ambientais (Machado et al., 1999). Outra vantagem é que a expressão das isoenzimas é normalmente codominante. Isso significa que os heterozigotos têm fenótipos diferentes dos homozigotos (Thorpe e Solé-Cava, 1994; Alfenas, 2006), ou seja, em um indivíduo diplóide, ambos os alelos de um loco são expressos e visualizados (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Este fato permite que parâmetros, como freqüências genótípicas e freqüências alélicas possam ser estimados e a partir deles se obterem coeficientes de diversidade genética e heterozigosidade, para que populações possam ser comparadas (Thorpe e Solé-Cava, 1994; Ferreira e Grattapaglia, 1998; Alfenas, 2006).

As freqüências gênicas e genótípicas que podem ser obtidas a partir da eletroforese de enzimas para indivíduos tomados ao acaso nas populações naturais podem ser transformadas em uma série de índices que permitem estimar o nível de similaridade ou de distância genética entre diferentes espécies e populações. (Solferini e Selivon, 2001).

Para medir a variabilidade genética de uma população, dois parâmetros são bastante utilizados. O primeiro é a heterozigosidade observada (H_o), que é a porcentagem de heterozigotos detectada para um determinado loco gênico. O outro é a heterozigosidade esperada (H_e) ou em equilíbrio, que é a proporção de heterozigotos que deveria haver se a população estivesse em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Solé-Cava, 2001).

A estatística F_{ST} de Wright é outro índice que reflete a proporção da variabilidade genética encontrada entre populações devido à subdivisão populacional. Segundo Wright (1978), valores de F_{ST} entre 0,15 e 0,25 indicam uma estruturação populacional moderadamente alta, enquanto valores acima de 0,25 refletem estruturação muito alta. A partir dos dados de F_{ST} podem ser estimadas as taxas de migração entre as subpopulações analisadas (Borba et al., 2000, 2001)

Em suma, os locos são analisados e podem ser considerados como uma amostra aleatória do genoma, sendo, assim, uma representativa da população. Os parâmetros obtidos são considerados como indicadores populacionais (Solferini e Selivon, 2001).

A técnica de eletroforese de isoenzimas é uma ferramenta que pode ser utilizada não só como método para estimar os níveis de variabilidade genética, mas também para identificar o fluxo gênico em populações naturais, no estudo da dispersão de espécies, na análise de filogenias e hibridização natural, bem como no melhoramento genético de espécies (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Alfenas, 2006).

Em estudos de sistemática, a eletroforese de isoenzimas apresenta, entre outras vantagens, a possibilidade de se obter dados adequados da descrição de uma espécie, a partir de um número pequeno de indivíduos amostrados (Avisé, 1974, Thorpe e Solé-Cava, 1994). Além disso, esta técnica pode também organizar espécies próximas, de acordo com a porcentagem de alelos ou genótipos compartilhados (Avisé, 1974). Segundo Thorpe e Solé-Cava (1994), se duas formas simpátricas forem da mesma espécie, devem ter as mesmas frequências gênicas em cada loco gênico. É possível dizer que, no mínimo, os dados de isoenzimas contribuem para a identificação bioquímica dos organismos (Buth e Murphy, 1999).

Portanto, o valor do papel das isoenzimas, como marcadores genéticos para as diversas áreas básicas de pesquisa genética, apresenta características positivas para serem utilizadas juntamente com outros marcadores moleculares, monitorando o mapeamento de características quantitativas (Zawadzki et al., 2005).

2.5. Variabilidade genética de populações naturais em pesquisas utilizando a técnica de eletroforese de isoenzimas e outras técnicas adicionais

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

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

A variabilidade genética de uma população pode ser quantificada por meio das freqüências gênicas obtidas com a análise de isoenzimas. Nestes casos, considera-se que os locos analisados retratam uma amostra aleatória do genoma e, dessa maneira, a população seria representante dessa amostra (Solferini e Selivon, 2001). As freqüências gênicas e genotípicas, obtidas a partir da eletroforese de enzimas para indivíduos tomados ao acaso nas populações naturais, são transformadas em uma série de índices que são interpretados como indicadores populacionais (Solferini e Selivon, 2001).

A técnica de eletroforese de aloenzimas tem auxiliado no alcance de bons resultados em várias pesquisas, na discriminação de novas espécies de peixes de

cabeceira, contribuindo para o aumento destes números. Como por exemplo, o estudo comparativo realizado por Zawadzki et al. (2004a) com *Neoplecostomus* sp. do córrego Taquari, afluente do rio Corumba (GO) e *Neoplecostomus paranensis* do ribeirão Hortelã, tributário do rio Paranapanema (SP), ambos pertencentes à bacia do alto rio Paraná. As espécies deste gênero apresentam uma similaridade morfológica e cariotípica que dificulta sua identificação. Assim, outras características seriam necessárias para identificar novas espécies deste grupo. A análise de 14 sistemas enzimáticos permitiu detectar 22 locos. Seis deles foram diagnósticos: Acp-A, Adh-A, Est-A, Gpi-A, Ldh-A e Ldh-B. A identidade genética de Nei (1978) foi de 0,731. Estes valores, juntamente com a presença de uma nadadeira adiposa, mostraram que os exemplares do córrego Taquari são distintos de *N. paranensis* e possivelmente representam uma nova espécie.

Em trabalho feito com dois morfótipos de *Hypostomus* – *Hypostomus nigromaculatus* e *H. cf. nigromaculatus* coletados no ribeirão Atlântico do alto da bacia do rio Paraná, com a utilização da técnica de isoenzimas, foi possível diferenciá-los, na qual obtiveram uma identidade genética de 0,6515 e uma distância genética de 0,4285 que mostrou também serem pertencentes a espécies diferentes (Ito et al., 2009).

Por meio das frequências gênicas obtidas pela análise de isoenzimas, é possível também quantificar a variabilidade genética de uma população. Peres et al. (2005b) estudaram a variabilidade genética de duas populações de *Astyanax altiparanae*, que é uma das espécies mais abundantes da bacia do alto rio Paraná e representam uma importante fonte de alimento para muitas espécies de peixes piscívoros comercializados. Um total de 13 enzimas foi analisado em amostras do fígado, coração, estômago, brânquia e músculo. A proporção de locos polimórficos foi de 52,38% para a população coletada na região de Porto Rico (PR) e 38,10% para a população localizada no ribeirão Ficha (RF). O cálculo da variabilidade genética indicou um valor de heterozigosidade de $0,1518 \pm 0,0493$ em *A. altiparanae* para a populações (PR) e $0,0905 \pm 0,0464$ para aqueles da população de RF. De acordo com os autores, os dados encontrados mostraram que as duas

populações são geneticamente diferentes e apresentaram um alto nível de variabilidade genética.

A variabilidade genética de *Leporinus lacustris*, coletados na lagoa do Carão na planície de inundação do rio Paraná, foi detectada também nos estudos de Peres e Renesto (2005a) por meio da técnica de eletroforese de isoenzimas. Neste estudo, os autores obtiveram uma proporção de *loci* polimórficos de 26,67 % e uma heterozigosidade média esperada de $0,0806 \pm 0,0313$, a qual foi menor que as estimadas em outros estudos feitos por Chiari e Sodré (2001) para este mesmo gênero. Os autores sugerem que essa diferença se faz presente por razão de *Leporinus lacustris* terem hábitos sedentários.

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

Outros métodos, por exemplo, os morfológicos, citogenéticos, análise de rDNA e análises genômicas, microsatélites entre outros, quando associados, podem apresentar uma melhor eficiência na identificação e diferenciação de espécies. Uma breve e atual revisão da utilização de alguns destes métodos são apresentados, como, por exemplo, o trabalho de Hermida et al. (2009) que buscou diferenciar duas linhagens de truta marrom (*Salmo trutta*) coletadas na bacia de Duero na Península Ibérica, uma coletada antes da separação espacial e congelada e a outra linhagem contendo as populações híbridas coletadas após a separação espacial. Neste estudo, a principal diferenciação morfométrica entre a linhagem pura foi relatada em características diferenciais na cabeça, que parece estar relacionada a uma melhor habilidade desta linhagem nos mecanismos de migração ou não migração. Os resultados deste trabalho confirmam a segregação espacial e diferenciação das espécies, que ratifica os resultados anteriores conduzidos pela técnica de eletroforese de aloenzimas e microsatélites, feitos por outros autores (Bouza et al., 2001; Martinez et al., 2007), com iguais linhagens.

Estudos citogenéticos freqüentemente têm sido utilizados em análises de relações filogenéticas. Alves et al. (2005) utilizaram desta técnica com o intuito de entenderem melhor a relação entre as subfamílias Hypostaminae e Neoplecostominae, estas pertencentes à família Loricariidae. Neste estudo, analisaram um total de 11 espécies, sendo duas da subfamília Neoplecostominae e nove de Hypostaminae. Os resultados obtidos mostraram a presença de um marcador cromossomal conservativo de $2n=54$ cromossomos e Ag NOR em todas as espécies. Os autores acreditam que este cariótipo pode representar uma condição primitiva da família Loricariidae, pois considera-se que os Neoplecostominae é o grupo irmão primitivo de todos loricarídeos, com exceção de Lithogeneinae. Suas conclusões mostraram ainda que as características citogenéticas encontradas entre as espécies podem reforçar a hipótese de que estas espécies podem pertencer a um grupo natural.

Chiachio et al. (2008) utilizaram dados moleculares, baseando-se na análise de seqüenciamento de dois exons e dois introns do gene nuclear conhecido como F-reticulon4, obtidos de espécies das subfamília Neoplecostominae e Hypoptopomatinae. Esta análise possibilitou a construção de árvores filogenéticas, englobando as relações entre espécies destas duas subfamílias, demonstrando portanto que a Hypoptopomatinae é um grupo parafilético visto que Neoplecostominae aparece dentro de Hypoptopomatinae, formando um grupo irmão com a tripo Otothyriini. As interações evolutivas observadas possibilitaram obter detalhadamente a história dessas subfamílias.

Monteiro et al. (2009), utilizando técnicas de citogenética e análises de medidas do tamanho do genoma, fizeram verificação da variabilidade genética de duas espécies do gênero *Iberochondrostoma* deste gênero analisando duas populações de *I. almacai* e quatro de *I. lusitanicum*. A análise citogenética permitiu observar um cariótipo de $2n=50$ cromossomos com uma esporádica triploidia de *I. lusitanicum*. Múltiplos NOR foram observados em ambas as espécies e uma alta variabilidade intra e interpopulacional foi observada em *I. lusitanicum*. Quanto às medidas do tamanho do genoma, verificou-se uma clara diferenciação do tamanho do genoma nas populações de *I. almacai*, com uma média de conteúdo de

DNA (pg) de 2,61pg que foi menor do que observado nas populações de *I. lusitanicum* 2,93pg, evidenciando uma variabilidade interpopulacional.

Sendo a variabilidade genética a herança evolutiva de uma espécie, 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. Porém, a perda da biodiversidade em ambientes aquáticos está entre os mais sérios problemas enfrentados pelos países ao redor do mundo (Moyle e Leidy, 1992). Diante disso, podemos verificar que as técnicas genéticas moleculares estão se tornando cada vez mais úteis na verificação da variabilidade de espécies. Os dados obtidos pela análise de aloenzimas, por exemplo, apesar de antiga, ainda apresenta sua importância e pode contribuir para várias áreas da biologia, pois representam o conhecimento básico da variabilidade genética, colaborando também na conservação de diferentes espécies de peixes de nossa fauna.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e Armazenagem

Os exemplares de *Neoplecostomus* utilizados neste estudo foram coletados no alto da bacia do rio Paraná. O Rio Paraná é o principal curso d'água da bacia, mas de grande importância também são seus afluentes e formadores, como os rios Grande, Paranaíba, Tietê, Paranapanema, Iguaçu, dentre outros (Maack, 2002).

A bacia do rio Paraná localiza-se quase que integralmente entre os paralelos 14° e 27° e os meridianos de longitude oeste 43° e 60°. Possui uma vazão média anual de 15.620 m³/s, volume médio anual de 495 Km³ e uma área de drenagem de 1.237.000 Km². A área desta bacia abrange os territórios dos Estados de Mato Grosso, Paraná, São Paulo e partes dos territórios dos Estados de Minas Gerais e Goiás, sendo a maior parte de sua área situada na região sudeste do Brasil (Maack, 2002).

As amostras de *Neoplecostomus* analisadas foram coletadas em três diferentes afluentes do Rio Paraná. Foram utilizadas nove populações, uma pertencente à espécie *Neoplecostomus corumba*, sendo cinco destas coletadas no rio Grande, localizado no estado de Minas Gerais, uma *Neoplecostomus corumba* no rio Paranaíba, em Goiás, e três populações coletadas no rio Tietê, no estado de São Paulo (Figura 1 e 2).

As coletas foram realizadas no mês de julho de 2007, resultando na captura de 106 exemplares, variando o número de indivíduos nas diferentes populações. As oito populações foram nomeadas de acordo com o local de coleta, como pode se visualizado na caracterização da coleta no Quadro 1 e Figura 2.

Imediatamente após coletados, os indivíduos foram congelados e armazenados em nitrogênio líquido (-196° C), para posterior análise genética laboratorial.

As análises genéticas foram feitas a partir da retirada de fragmentos de tecidos (músculo branco) dos indivíduos, não utilizando outros tecidos em razão dos exemplares apresentarem um tamanho reduzido e por isso ser difícil a retirada de tecidos de outros órgãos, como fígado, coração e rim.

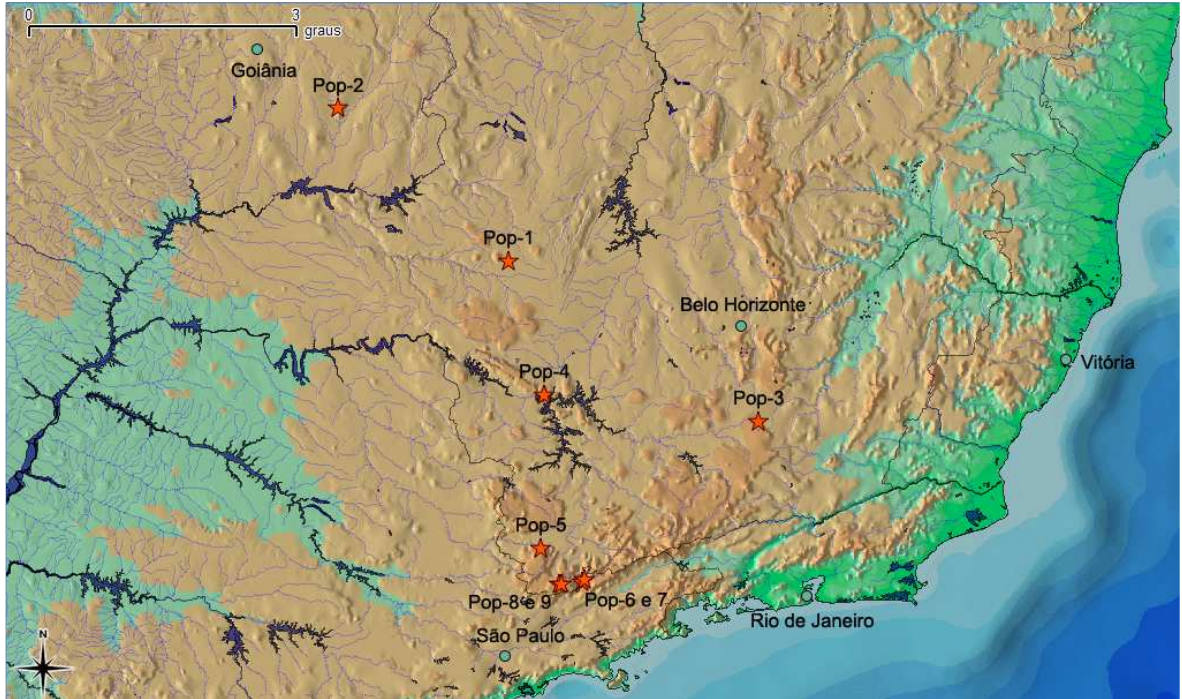


Figura 1 - Mapa geográfico da bacia do rio Paraná, mostrando as localidades dos 9 exemplares analisados. Pop 1: Cachoeira; Pop 2: *Neoplecostomus corumba*; Pop 3: Carandaí; Pop 4: Tamborete; Pop 5: Espraiado; Pop 6: Piranguçu; Pop 7: Monjolinho; Pop 8: Casca D'Antas e Pop 9: Jaguari.

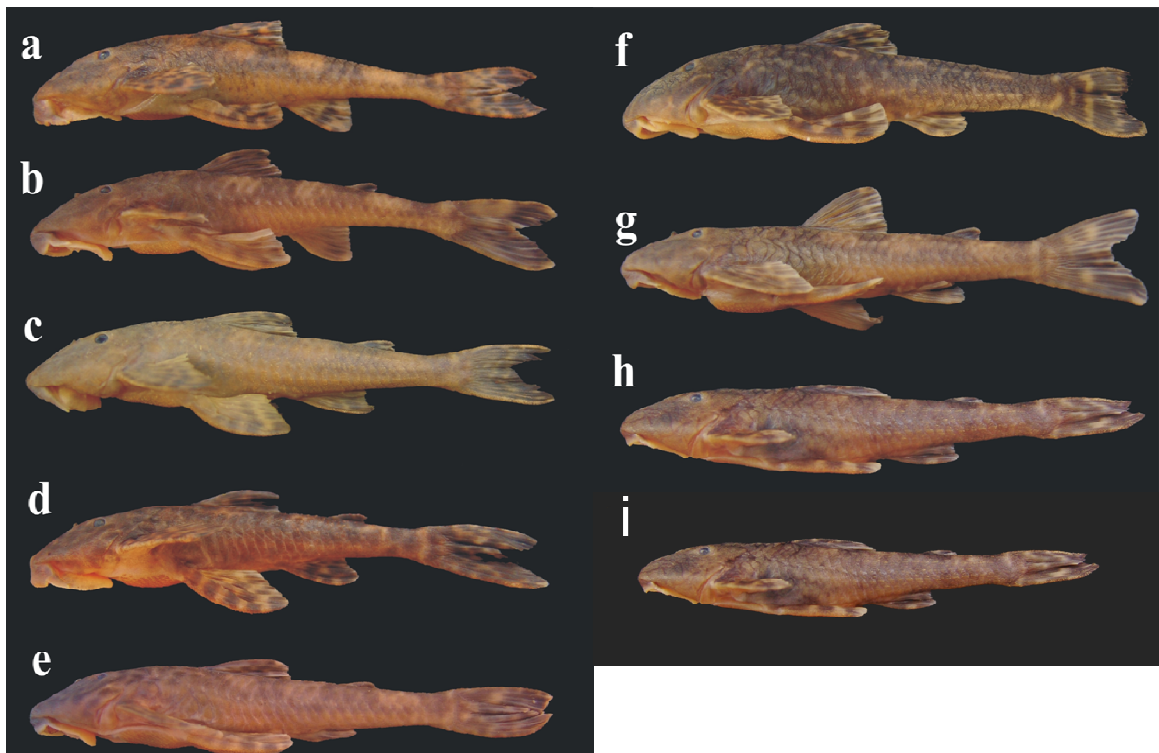


Figura 2 - Exemplares de *Neoplecostomus* coletado nos diferentes afluentes do Alto do rio Paraná: a: Cachoeira, b: *Neoplecostomus corumba*, c: Carandaí, d: Tamborete, e: Espraiado, f: Piranguçu, g: Monjolinho, h: Casca D'Antas, i: Jaguari.

Quadro 1 - Caracterização da coleta, locais da coleta, Bacia Hidrográfica, Municípios próximos, Coordenadas Geográficas e número de indivíduos analisados em cada população (Pop 1: Cachoeira; Pop 2: *Neoplecostomus corumba*; Pop 3: Carandaí; Pop 4: Tamborete; Pop 5: Espraiado; Pop 6: Piranguçu; Pop 7: Monjolinho; Pop 8: Casca D'Antas e Pop 9: Jaguari)

Populações	Local de coleta	Bacia hidrográfica	Município	Coordenadas Geográficas	Indivíduos analisados
Pop-1	Rio Quebra Anzol	Rio Paranaíba	Ibiá (MG)	19°9'5.57"S/ 46°33'40.93"O	26
Pop-2	Rio Taquari	Rio Paranaíba	Caldas Novas (GO)	17°25'56.46"S/ 48°22'20.17"O	12
Pop-3	Córrego sem nome afluente do rio Carandaí	Rio Grande	Carandaí (MG)	20°57'20.70"S/ 43°45'47.20"O	5
Pop-4	Córrego Tamborete	Rio Grande	Capitólio (MG)	20°38'54.77"S/ 46°9'52.40"O	10
Pop-5	Ribeirão espraçado	Rio Grande	Borda da Mata (MG)	22°21'49.10"S/ 46°11'57.52"O	16
Pop-6	Rio Piranguçu	Rio Grande	Piranguçu (MG)	22°44'33.91"S/ 45°44'21.47"O	17
Pop-7	Córrego Monjolinho	Rio Grande	S. Bento do Sapucaí (MG)	22°42'47.04"S/ 45°42'57.04"O	11
Pop-8	Córrego Casca D'antas	Rio Tietê	Camanducaia (SP)	22°46'08"S/ 45°59'25"O	5
Pop-9	Rio Jaguari	Rio Tietê	Camanducaia (SP)	22°45'52.03"S/ 45°58'35.49"O	4

Representantes de cada população foram depositados na coleção do Núpelia (NUP = Núcleo regional de Pesquisa em Liminologia, Ictiologia e Aquicultura), da Universidade Estadual de Maringá e no Museu Nacional do Rio de Janeiro na Universidade Estadual do Rio de Janeiro (MNRJ) com as seguintes identificações: NUP6582- CP 65.6mm, NUP 6568-CP 80.3mm, MNRJ 31879-CP 8.61mm, MNRJ28659-CP 69.2mm, NUP3571-CP 84.8mm, NUP6033-CP 88.1mm, MNRJ23974-CP 79.2mm, NUP6586-CP 72.1mm e NUP6586-CP 72.1mm, sendo CP = comprimento padrão.

3.2. Eletroforese em gel de amido

A técnica de eletroforese foi realizada em gel horizontal em um sistema contínuo. Para tanto, foram utilizados géis a uma concentração de 15%, preparados

com amido de milho (Penetrose 50) em solução tampão. A solução foi aquecida até a fervura e então vertida em uma placa de vidro com bordas de 0,6 cm.

Foram analisados seis sistemas isoenzimáticos, utilizando o tampão Tris Citrato (TC), pH 7,0: Tris 0,135 M/Ac. Cítrico 0,043 M, na cuba de eletroforese, e o mesmo tampão diluído 15 vezes no preparo do gel. Após o esfriamento, os géis permaneceram sob refrigeração por aproximadamente 24 horas.

As amostras dos tecidos foram homogeneizadas com bastão de vidro, em tubos de propileno (1,5 ml) com 100 µL de tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm (16434,6 x g), com temperatura entre 1 °C a 5 °C, durante 20 minutos. O extrato protéico (sobrenadante) foi aplicado no gel com pequenas tiras de papel-filtro (4 mm x 8 mm) Whatman 3MM[®] embebida com as amostras. Em seguida, foi submetido à eletroforese sob refrigeração, durante 17 horas. A corrente elétrica nos géis, medida através de suas extremidades com um multímetro, foi de aproximadamente 50V (210 V na fonte). Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado horizontalmente em fatias, as quais foram incubadas com soluções histoquímicas específicas para cada sistema, preparadas segundo protocolo de Murphy et al. (1996).

Após incubação do gel no escuro e em temperatura de 37°C, aguardou-se até a visualização das bandas nos géis, estes foram colocados em uma solução conservante, constituída de Metanol/água/ácido acético na proporção de 5:5:1, por 24 horas e em seguida fotografados e analisados.

3.3. Análises das isoenzimas

Os seis sistemas enzimáticos analisados em gel de amido estão descritos no Quadro 2. A nomenclatura das enzimas utilizadas foi proposta por Murphy et al. (1996). A interpretação genética foi baseada na estrutura quaternária das enzimas segundo Ward et al. (1992). Todas as estimativas estatísticas foram calculadas usando o programa Pop gene 3.1 (Yeh et al., 2009), tais como variabilidade genética estimada pelo cálculo da heterozigosidade (H_e e H_o), de acordo com Nei (1978), os parâmetros estatístico de fixação (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}) de Wright (1978), os valores das frequências alélicas, a identidade (I) e a distância genética (D) de Nei (1972). A

partir destas duas últimas medidas foi construído um dendrograma (método de agrupamento pelo algoritmo UPGMA - Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means) das populações estudadas.

Quadro 2 - Nome, número de Comissão de Enzima (nº E.C.) e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido

Enzima (Abreviação)	nº.E.C	E.Q
Glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3pdh)	1.1.1.8	Dimérica
Glicose 6 –fosfato isomerase (Gpi)	5.3.1.9	Dimérica
L- lactato desidrogenase (Ldh)	1.1.1.1.27	Tetramérica
Malato desidrogenase (Mdh)	1.1.1.37	Dimérica
Fosfoglucomutase (Pgm)	5.4.2.2	Monomérica
Isocitrato desidrogenase (Idh)	1.1.1.14	Dimérica

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises dos dados eletroforéticos obtidos, permitiram identificar 10 *loci* e 24 alelos, dentre os seis sistemas isoenzimáticos estudados nas nove populações de *Neoplecostomus*. Destes 24 alelos detectados, observou-se que *Neoplecostomus corumba*, comparado às demais populações, foi o único que apresentou o alelo *e* no locus *Gpi-B*, mas a presença do alelo *b* para o loci *Gpi-A* e *Idh* e o alelo *a* no locus *Gpi-B* foi observada somente nas populações de Cachoeira e Espriado respectivamente (Quadro 3).

Quadro 3 - Estimativas de frequências alélicas das populações de *Neoplecostomus*. (P1: Cachoeira; P 2: *N.corumba*; P3: Carandaí; P 4: Tamborete; P 5: Espriado; P 6: Piranguçu; P 7: Monjolinho; P 8: Casca D'antas e P 9 : Jaguari. Valores em negrito indicam alelos exclusivos. N^o: número de indivíduos analisados)

<i>Locus</i>	alelo	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P6	P7	P8	P9
<i>G3-1</i>	<i>a</i>	-	0,1667	1,0000	-	-	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	<i>b</i>	1,0000	0,8333	-	1,0000	1,0000	-	-	-	-
<i>G3-2</i>	<i>a</i>	0,312	0,3750	1,0000	1,0000	0,0769	-	-	-	-
	<i>b</i>	0,9688	0,6250	-	-	0,9231	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Gpi-A</i>	<i>a</i>	0,9808	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	<i>b</i>	0,0192	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gpi-B</i>	<i>a</i>	-	-	-	-	0,9375	-	-	-	-
	<i>b</i>	1,0000	0,1000	0,7000	1,0000	0,0625	0,7647	0,9545	1,0000	1,0000
	<i>c</i>	-	0,4500	-	-	-	0,0588	-	-	-
	<i>d</i>	-	-	0,3000	-	-	0,1765	0,0455	-	-
	<i>e</i>	-	0,4500	-	-	-	-	-	-	-
<i>Idh</i>	<i>a</i>	0,2600	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	<i>b</i>	0,7400	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ldh-A</i>	<i>a</i>	-	0,1667	0,6000	1,0000	0,0714	-	-	-	-
	<i>b</i>	1,0000	0,8333	0,4000	-	0,9286	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Ldh-B</i>	<i>a</i>	-	0,1667	0,6000	1,0000	0,0714	-	-	-	-
	<i>b</i>	1,0000	0,8333	0,4000	-	0,9286	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Mdh-A</i>	<i>a</i>	0,8846	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9412	1,0000	1,0000	1,0000
	<i>b</i>	0,1154	-	-	-	-	0,0588	-	-	-
<i>Mdh-B</i>	<i>a</i>	-	-	0,6000	1,0000	0,0625	0,5588	-	1,0000	0,7500
	<i>b</i>	1,0000	1,0000	0,4000	-	0,9375	0,4412	1,0000	-	0,2500
<i>Pgm</i>	<i>a</i>	-	0,0833	-	0,0500	-	-	0,1818	1,0000	-
	<i>b</i>	1,0000	0,8333	0,2000	0,0500	0,0714	-	0,0455	-	0,5000
	<i>c</i>	-	0,0833	0,8000	0,0000	0,9286	1,0000	0,7727	-	0,5000
N ^o		26	12	05	10	16	17	11	05	04

Em estudos realizados por Zawadzki et al. (2004a) com populações de *Neoplecostomus corumba*, foram analisados 14 sistemas isoenzimáticos, dos quais cinco foram similares à nossa pesquisa. Comparamos este dados à população de *N. corumba* analisada em nosso estudo e identificamos que cinco alelos presentes em nossa pesquisa não estiveram presentes no estudo de Zawadzki et al. (2004a), mesmo sendo estas populações representantes da mesma espécie.

A expressão enzimática dos alelos detectados está ilustrada nos zimogramas representados pela Figura 3. Observa-se que o alelo *a* para os *loci* Gpi-A, Idh e Mdh-A foram os únicos que estiveram presentes em todas as populações. Nesta Figura, é possível observar também que em *N. corumba* três sistemas isoenzimáticos (G3PDH, LDH e PGM) revelaram todos os alelos dos locos dos sistemas enzimáticos analisados, representando a população com maior frequência de alelos comparada com as oito populações estudadas. Visualizou-se ainda que dentre os *locus* a enzima GPI apresentou um maior número de alelos por loco (sete alelos) na qual *N. corumba* e a população de Piranguçu foram os representantes mais frequentes a estes alelos, enquanto a enzima IDH apresentou um menor número de alelos (dois alelos).

As estimativas das frequências alélicas, mostradas no Quadro 3, foram utilizadas no teste de qui quadrado de homogeneidade, que demonstram a diferenciação entre as populações. Neste estudo, dos 10 *loci* analisados em todas as populações, oito apresentaram frequências alélicas diferentes ($p < 0,05$) e apenas dois loci (*Mdh-A* e *Gpi-B*) apresentaram frequências alélicas semelhantes ($p > 0,05$). A maior proporção de *loci* com frequências alélicas diferentes ($p < 0,05$) detectadas aqui podem indicar, segundo Frankel et al. (1995), que a diversidade genética deve ser maior entre as populações do que dentro das populações. Portanto, pode-se admitir que a maior semelhança nas frequências alélicas de uma população é um indicador de maior diversidade genética nessas populações (intrapopulacional), estando estas populações mais protegidas dos efeitos da deriva genética se comparados a que tem alelos muito menos frequentes ou diferentes, como observado na maioria dos *loci* das populações estudadas.

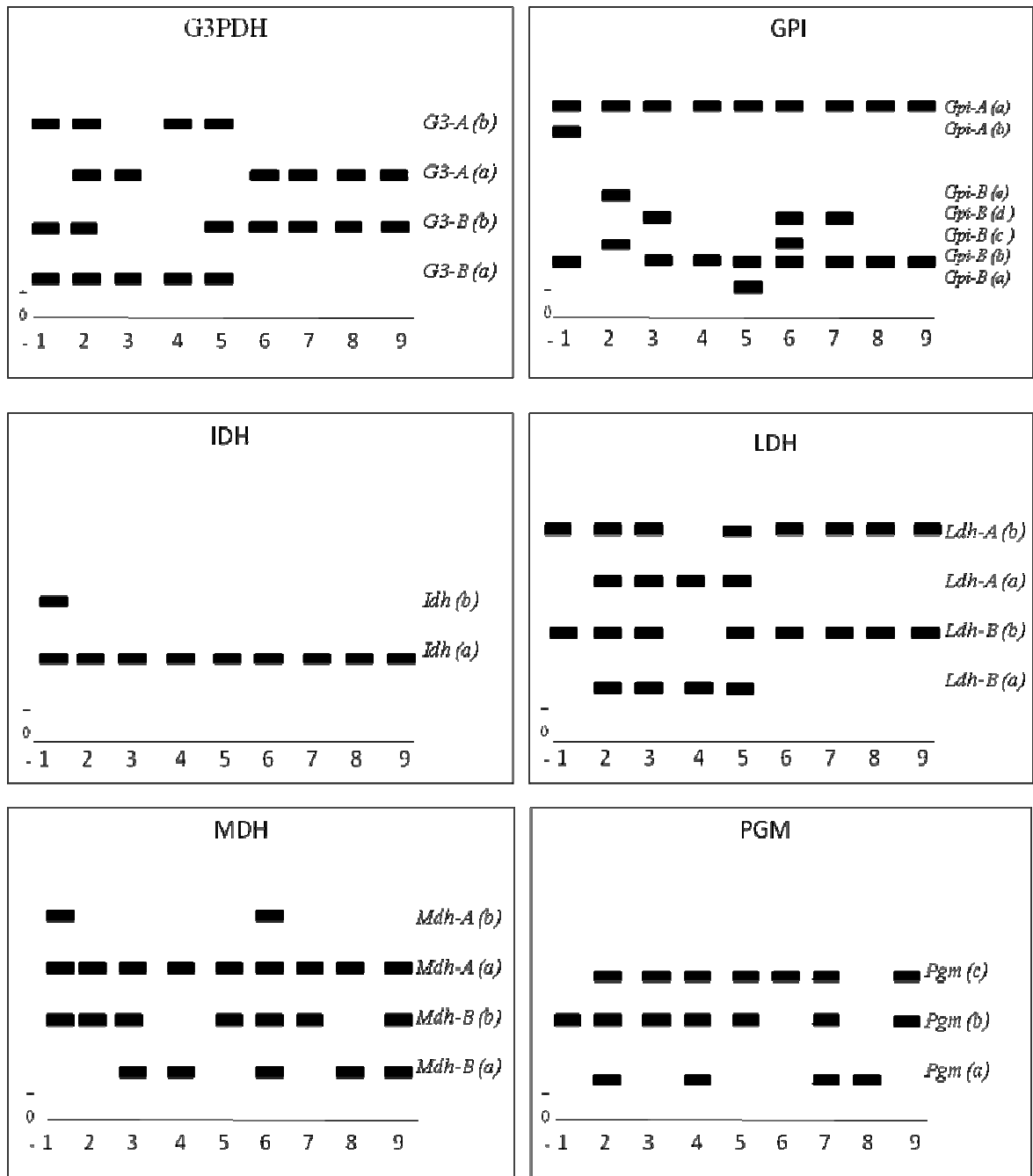


Figura 3 - Zimograma dos sistemas enzimáticos analisados em gel de amido, com os seus respectivos alelos, presentes nas populações (1= Cachoeira; 2= *N. corumba*; 3= Carandaí; 4= Tamborete; 5= Espreado; 6= Piranguçu; 7= Monjolinho; 8= Casca D´Antas; 9= Jaguari).

A observação das frequências alélicas permitiu ainda identificar quatro alelos exclusivos. Dois deles foram encontrados na população de Cachoeira nos loci *Gpi-A(b)* e *Idh(b)* com frequências de 0,0192 e 0,7400, respectivamente, enquanto a população de *N. corumba* apresentou o alelo *Gpi-B(e)*, com frequência de 0,4500, e

a população de Espiraiado o alelo *Gpi-B (a)*, com frequência de 0,9375 (Quadro 3). Dos quatro alelos exclusivos, o loco *Gpi-A(b)*, presentes na população de Cachoeira com frequência de 0,0192, pode ser considerado ainda como um alelo raro, devido a sua baixa frequência. Os demais alelos exclusivos apresentam uma frequência considerada elevada. Nesta situação, tais frequências poderiam ser indicadas como um marcador genético para tais populações.

Estudos de Zawadzki et al. (2004a) compararam *Neoplecostomus sp.* com *Neoplecostomus paranensis* e identificaram cinco *loci* que apresentaram alelos diferentes em ambas as populações. Reusing (2009), analisando duas populações de *Neoplecostomus sp.*, observou a diferenciação em nove locos (*Aat, Acp, Adh, Gdh, Idh, Mdh-C, Pgm, Sorb-1, Sorb-2*) dos 19 obtidos, com a presença de alelos exclusivos para cada morfótipo, com 100% de frequência. Philippsen et al. (2009) analisando quatro populações de *Neoplecostomus yapo*, de diferentes regiões do rio Paranapanema, verificaram a presença de dois alelos exclusivos nos locos *Gdh (a)* e no loco *Gpi-B (a)*. A exclusividade alélica foi observada também nos trabalhos feitos por Ito et al. (2009) em dois morfótipos de *Hypostomus*, nos quais detectaram vários alelos exclusivos, com 100% de frequência em seis *loci* diagnosticados (*Aat-2, Gdh-1, Gpi-A, Idh-1, Ldh-A, Mdh-A*).

Os alelos exclusivos, observados nas três populações de *Neoplecostomus* analisadas aqui, demonstram que as altas frequências a esses alelos, com exceção do alelo *b* para o locus *Gpi-A* presente na população de Cachoeira que apresentou menor frequência, podem estar sendo rapidamente fixados nestas populações. De acordo com Thorpe (1994), novos alelos aparecerão inicialmente em frequências baixas na população e o destino evolutivo dos novos alelos dependerá de seu desempenho fisiológico relativo (valor adaptativo ou valor seletivo) e de mudanças casuais da frequência, quando transmitido para gerações seguintes. Portanto, a provável razão da presença desses alelos exclusivos pode ser o simples fruto da amostragem, uma vez que o tamanho da amostra é pequeno ou, mais provavelmente, do isolamento das populações ou, ainda, devido a mutações em regiões do DNA que codificam uma determinada enzima, que em condições eletroforéticas pode diferenciar indicando um novo alelo.

As diferenciações genéticas intrapopulacional descritas a seguir foram baseadas nas estimativas das percentagens de *loci* polimórficos, número de alelo por *locus* e heterozigosidade obtidas.

Em relação à proporção de *loci* polimórficos, observou-se que com exceção da população de Casca D'Antas, que não apresentou nenhum polimorfismo, todas as demais populações apresentaram *loci* polimórficos. O *Neoplecostomus corumba*, juntamente com a população de Espreado, apresentaram a maior porcentagem de *loci* polimórficos, iguais a 60%, seguido da população de Carandaí com 50%, e a população de Cachoeira, com 40%, as demais populações apresentaram taxas de polimorfismo menores ou iguais a 30% (Quadro 4).

Uma situação semelhante à população de Casca D'Antas, com relação à ausência de polimorfismo, foi encontrado em *Hypostomus* por Paiva (2006) e em *Neoplecostomus yapo* por Philippsen et al. (2009). Ao analisarem quatro populações de cada gênero, observou-se que tanto a população de *H. albopunctatus* e duas populações de *Neoplecostomus yapo* não apresentaram nenhum polimorfismo. Uma provável explicação indicada pelos autores é que esteja ocorrendo um processo de endogamia, devido aos hábitos sedentários destas espécies. No entanto, nos exemplares da população de Casca D'Antas é mais provável que esteja relacionado à amostragem, assim como o polimorfismo detectado em populações de Jaguari, e o alto polimorfismo observado em Carandaí, visto que o número de indivíduos analisados, nestas populações, foi pequeno.

A presença de *loci* polimórficos detectados na maioria das populações estudadas tem sido observada em vários trabalhos, como de Reusing (2009), estudando *Neoplecosotomus sp. 1*, coletados no riacho Paraitinguinha (Salesópolis), que observou polimorfismo em um único loco (*Idh*) de apenas 5,26%. Zawadzki et al. (1999), utilizando três populações de *Hypostomus* da bacia do rio Iguaçu, encontraram porcentagem de locos polimórficos que variaram de 20 a 40%. Limeira et al. (2009), em duas populações de *Rineloricaria pentamaculata*, encontraram polimorfismo em 13,64% dos locos para a população do Ribeirão Keller e 9,09% para a população do rio São João.

Quanto ao número médio de alelos por *locus* verificou-se uma variação de 1,8–1,0, sendo o maior número de alelos encontrados na população de *N. corumba* (1,8) e o menor número encontrado na população de Casca D’Antas (1,0), que apresentaram apenas um alelo para cada loco, portanto, todos monomórficos (Quadro 4). Em *Neoplecostomus corumba*, Zawadzki et al. (2004a) encontraram uma variação de alelos por loco de 1,1. Comparando os dois estudos, observou-se que a diferença de alelos por loco é devido aos cinco alelos novos que identificamos nos *loci* *G3-A*, *Gpi-B*, *Ldh-A* e *Pgm*, não presentes no estudo de Zawadzki et al. (2004a).

Os valores de heterozigosidade esperados, observados e apresentados no Quadro 4 mostram as variações entre os *loci* das populações analisadas. Em uma visão geral dos resultados obtidos, identificou-se que a heterozigosidade esperada foi maior do que a observada em todas as populações analisadas, com exceção da população de Casca D’Antas, que não obteve variabilidade, apresentando apenas indivíduos homozigotos. Em âmbito geral, os resultados sugerem um excesso de homozigotos nas populações, em relação ao esperado pelas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg (E.H W).

Quadro 4 - Heterozigosidade esperada e observada (H_o e H_e); percentagem de *loci* polimórficos (P) e número de alelos por *loci* (K). Entre parênteses esta o desvio padrão

Populações	H_e	H_o	P%	K
Cachoeira	0,0702 (0,1307)	0,0461 (0,1124)	40%	1,4000 (0,5164)
<i>N. corumba</i>	0,2303 (0,2239)	0,1567 (0,3059)	60%	1,8000 (0,7888)
Carandaí	0,2422 (0,2605)	0,0600 (0,1897)	50%	1,5000 (0,5270)
Tamborete	0,0195 (0,0616)	0,0100 (0,0316)	10%	1,2000 (0,6325)
Espraiado	0,0802 (0,0625)	0,0000 (0,0000)	60%	1,6000 (0,5164)
Piranguçu	0,1014 (0,1892)	0,0412 (0,1111)	30%	1,4000 (0,6992)
Monjolinho	0,0476 (0,1220)	0,0182 (0,0383)	20%	1,3000 (0,6749)
Casca D’Antas	0,0000 (0,0000)	0,0000 (0,0000)	0,0%	1,0000 (0,0000)
Jaguari	0,1095 (0,2376)	0,0000 (0,0000)	20%	1,2000 (0,4216)

Segundo Zawadzki et al. (2004a), a incomum ausência de variabilidade genética aloenzimática em *N. paranensis*, do córrego Hortelã, poderia ser explicada pela alta força endogâmica e restrições ecológicas mantidas por eficientes barreiras geográficas para espécies de *Neoplecostomus*. Da mesma forma, os baixos níveis de variabilidade genética de *Neoplecostomus* da região de Casca D'Antas podem indicar que esta população é sedentária e restrita a pequenas áreas e, provavelmente, este fator esteja relacionado ao tamanho reduzido da amostra coletada nesta região, e isso pode estar relacionado à baixa probabilidade de detectar a variabilidade nesta população.

De forma mais detalhada, no Quadro 4, verifica-se que a maior heteroziguidade observada foi em *Neoplecostomus corumba* com $H_o = 0,1567$, seguido da população de Carandaí com $H_o = 0,0600$, valor este $0,0967$ menor que em *N. corumba*, apesar da população de Carandaí esperar uma heteroziguidade de $H_e = 0,2422$, valor maior do que todas as demais populações, até mesmo comparado com *N. corumba* com $H_e = 0,2303$. Comparado a outros estudos, o valor de H_e encontrado na região de Carandaí também foi considerado elevado, como em *Neoplecostomus* sp. 1, analisada por Reusing (2009) com $H_e = 0,0069$, a obtida por Zawadzki et al. (2004a) para *Neoplecostomus* sp. de outra localidade com $H_e = 0,030$ e a de Lassala e Renesto (2007), que identificaram valores de heteroziguidade de $0,084 \pm 0,025$ para *Roeboides paranensis* e $0,045 \pm 0,020$ para *Serrasalmus marginatus*.

Comparativamente, observa-se que os valores encontrados neste trabalho estão de acordo e acima da média encontrada das espécies de peixes no mundo todo (0,051), com exceção da população de *Neoplecostomus*, coletada na região de Monjolinho (0,0476), Tamborete (0,0195) e Casca D'Antas (0,000), que apresentou valores menores. Portanto, podemos dizer que, de forma geral, as populações estudadas apresentaram uma alta variabilidade genética.

Outras medidas que podem ser utilizadas, também na observação dos valores de deficiência de heterozigotos em cada subpopulação e nas populações totais, respectivamente, são os parâmetros estatísticos de fixação F_{IS} , F_{IT} de Wright. Para detectar a proporção da variabilidade genética entre populações, é utilizado

ainda o índice de fixação F_{ST} . Segundo Wright (1978), quando a média dos valores de F_{IS} e F_{IT} apresenta valores positivos, representa excesso de indivíduos homozigotos na subpopulações e nas populações totais respectivamente, enquanto os valores resultantes de F_{ST} abaixo de 0,15 refletem uma baixa diferenciação das populações, entre 0,15 e 0,25 indicam uma diferenciação populacional moderadamente alta e os valores acima de 0,25 refletem diferenciação muito alta.

As análises das medidas destes parâmetros populacionais de (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}) são indicados no Quadro 5.

Quadro 5 - Estatística de Wright para as oito populações de *Neoplecostomus* e *N. corumba* coletada no Alto da bacia do rio Paraná. T = tamanho da amostra

<i>Locus</i>	T	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>G3-1</i>	79	1,0000	1,0000	0,9369
<i>G3-2</i>	85	0,1621	0,8436	0,8133
<i>Gpi-A</i>	104	-0,2229	0,5150	0,6034
<i>Gpi-B</i>	106	-0,0196	-0,0021	0,0171
<i>Idh</i>	105	0,0644	0,7350	0,7197
<i>Ldh-A</i>	104	1,0000	1,0000	0,6956
<i>Ldh-B</i>	104	1,0000	1,0000	0,6956
<i>Mdh-A</i>	106	1,0000	1,0000	0,0784
<i>Mdh-B</i>	106	0,9599	0,9867	0,6698
<i>Pgm</i>	102	0,8010	0,9317	0,6568
Média	100	0,5621	0,8716	0,7067

Observou-se que o valor médio positivo, do índice de fixação F_{IS} (0,5621) e o valor de F_{IT} (0,8716) para as oito populações mais *N. corumb*, confirma também o excesso de indivíduos homozigotos. O valor da média obtida para $F_{ST} = 0,7067$ indicou que as oito populações analisadas de *Neoplecostomus* e a espécie de *N. corumba* apresentam características genéticas diferentes umas das outras que, de acordo com Wright (1978), corresponde a uma alta diferenciação genética. Resultado diferente foi encontrado no trabalho de Philippsen et al. (2009),

analisando quatro populações de *Neoplecostomus yapo* observaram $F_{ST} = 0,1039$, verificando baixa diferenciação genética entre estas populações

As medidas do índice de fixação F_{IS} têm sido relatado de forma crescente em trabalhos relacionados à diferenciação de espécies, como observado em dois morfótipos de *Hypostomus*, um valor $F_{IS} = 0,312$ para *H. nigromaculatus* e de 0,455 para *H. cf. nigromaculatus* (Ito et al., 2009) e o trabalho feito por Santos (2009), que fez uso deste parâmetro para estimar a variabilidade genética de *Oligosarcus paranensis*, obtendo um índice de $F_{IS} = 0,5145$. Os resultados obtidos por estes autores, semelhantemente aos nossos, encontraram um excesso de indivíduos homozigotos apresentando valores de F_{IS} positivos. Ao contrário destes, Reusing (2009) detectou um valor de $F_{IS} = - 0,0741$ negativo, observando um excesso de indivíduos heterozigotos em duas populações de *Neoplecostomus sp.*

A identidade genética (I) indica a proporção dos produtos dos genes, que não são diferenciados por procedimentos eletroforéticos (Dobzhansky et al., 1977) e seu valor varia de 0 a 1. Segundo Thorpe e Solé-Cava (1994), 85% dos valores de I, entre espécies do mesmo gênero, excedem 0,35, e 97% dos valores estão abaixo de 0,85. Entre espécies de gêneros diferentes este valor, em 77% dos casos, é menor que 0,35, enquanto que, para populações da mesma espécie 98% excede 0,85. Baseado nisso, verificou-se que a relação dos valores de identidades genéticas observadas entre o *N. corumba* e as oito populações mostraram que as populações mais próximas a esta espécie foi a população de Cachoeira, que resultou em uma semelhança de $I = 0,84$. Posteriormente, a população de Espraiado, com $I = 0,83$; seguido das populações de Monjolinho, Jaguari e Piranguçu, com $I = 0,77, 0,74, 0,71$, respectivamente. As menores identidades encontradas nas relações entre *N. corumba* foram observadas nas populações de Carandaí, Casca D' Antas e Tamborete, com identidades de 0,65, 0,63 e 0,54. Diante disso, de acordo com os valores estabelecidos por Thorpe (1982), é suposto que as populações de Cachoeira e Espraiado poderiam ser da mesma espécie que *N. corumba*, por apresentarem valores de Identidade genética próximos a 0,85, enquanto as demais populações representariam espécies de um mesmo gênero que *N. corumba*, por razão de apresentarem valores de (I) superiores a 0,35 e menores que 0,85. (Quadro 6).

Quadro 6 - Valores de identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1972), entre as nove populações de *Neoplecostomus*. (1 = Cachoeira; 2 = *N.corumba*; 3 = Carandaí; 4 = Tamborete; 5 = Espraiado; 6 = Piranguçu; 7 = Monjolinho; 8 = Casca D'antas; 9 = Jaguari)

Pop.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	*****	0,8408	0,4988	0,4400	0,7499	0,6826	0,7524	0,6315	0,7424
2	0,1734	****	0,6536	0,5436	0,8348	0,7177	0,7721	0,6379	0,7418
3	0,6956	0,4252	****	0,8253	0,6027	0,7909	0,7534	0,6898	0,7754
4	0,8210	0,6096	0,1921	****	0,5448	0,5490	0,4816	0,5097	0,5521
5	0,2879	0,1806	0,5064	0,6074	****	0,7836	0,7990	0,6148	0,7219
6	0,3818	0,3317	0,2345	0,5996	0,2439	****	0,9586	0,8704	0,9631
7	0,2845	0,2587	0,2832	0,7307	0,2244	0,0422	****	0,8328	0,9229
8	0,4597	0,4495	0,3713	0,6739	0,4864	0,1388	0,1830	****	0,9160
9	0,2878	0,2987	0,2544	0,5940	0,3258	0,0376	0,0802	0,0877	****

A distância de Nei (1972) estima o número médio de substituições de nucleotídeos por *locus*, detectáveis por eletroforese e acumuladas nas populações, desde que elas tenham um ancestral em comum, ou seja, a substituição é proporcional ao tempo evolutivo (Dobzhansky et al., 1977; Thorpe, 1982; Thorpe e Solé-Cava, 1994). De acordo com os valores de distância genética observados, *Neoplecostomus corumba* estaria ligado mais proximamente à população de Cachoeira, com a menor distância $D= 0,1735$, e Espraiado, com $D= 0,1806$; seguido de Monjolinho, Jaquari e Piranguçu, representando uma distância média de $D= 0,2587$, $0,2987$ e $0,3317$, respectivamente. As maiores distâncias entre *N. corumba* foram com relação às populações de Carandaí com $D= 0,4252$ e Tamborete com $D= 0,6096$ (Quadro 6).

A utilização das medidas de identidade genética e distâncias genéticas foram utilizadas também no trabalho de Zawadzki et al. (2004a), fazendo uma análise comparativa entre duas populações de *Neoplecostomus* (*Neoplecostomus sp.* e *Neoplecostomus paranensis*), encontraram uma identidade $I= 0,731$ e distância $D = 0,314$, valores estes próximos a de alguns morfótipos encontrados por Paiva et al. (2005). Estes autores, estudando três populações de *Hypostomus*, obtiveram $I=$

0,780 para *Hypostomus strigaticeps* e *Hypostomus sp.1* e $D = 0,218$ entre *H. regani* e *H. abopunctatus*, valores estes que estabelecem uma provável diferenciação entre as populações analisadas por estes autores, devido aos valores de $0,35 < I < 0,85$ e as distâncias serem equivalentes a diferenciação. Philippsen et al. (2009), utilizando estes parâmetros, confirmaram a hipótese de que quatro populações de *Neoplecostomus* pertencem à espécie *yapo*, ao observarem as identidades genéticas $I = 0,999$, ou seja, maiores que 0,85 e distâncias baixíssimas entre as populações.

Os dados de distâncias e identidades genéticas encontrados foram utilizados para construir um dendograma, que permite estimar as relações genéticas entre as populações estudadas (Thorpe e Solé-Cava, 1994). A Figura 4 mostra o dendograma construído pelo método UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic mean). As análises, dos clusters do dendograma demonstraram que as oito populações + *N. corumba* ficaram agrupadas em três conjuntos: Cachoeira+ *N. corumba*+Espraiado, Piranguçu+Jaguari+Monjolinho+Casca D'Antas e Carandaí+Tamborete. De acordo com o critério de Thorpe e Solé-Cava (1994), teríamos três espécies, no mínimo, entre estas populações.

Os valores de identidade genética e a topologia do dendograma de similaridade (Figura 4) mostram uma relação de proximidade entre as populações e a espécie *N. corumba* bastante coerente com suas posições geográficas. As análises demonstraram que as populações de Cachoeira e *N. corumba* foram as mais similares, geneticamente, seguidas da população de Espraiado. As duas primeiras habitam riachos da bacia do rio Paranaíba, enquanto a última encontra-se na bacia do rio Grande. *Neoplecostomus corumba* é encontrada em riachos da bacia do rio Corumbá, um tributário da margem direita do rio Paranaíba, enquanto a população de Cachoeira habita riachos da bacia do rio Quebra Anzol, um tributário da margem esquerda do rio Paranaíba. Geneticamente, estas populações são diferenciadas pelo locus *Idh* (Figura 3), enquanto, morfologicamente (Figura 2 a, b), a ausência da nadadeira adiposa da população de Cachoeira distingue-as prontamente, uma vez que Zawadzki et al. (2008) reforçam a ausência versus presença de nadadeira adiposa como caráter diagnóstico em *Neoplecostomus*. A população de Espraiado, dos riachos formadores dos trechos superiores do rio Mogi Guaçu pertencente à

drenagem do rio Grande, comparada às demais populações do clado da qual pertence, está localizada em diferente região geográfica. Contudo, geneticamente o locus *Gpi-A* e *Gpi-B* diagnostifica as três populações, uma vez que *N. corumba* tem fixo o alelo *e*, a população de Espirado o alelo *a* para *Gpi-B* e população de Cachoeira apresentou a exclusividade do alelo *b* para a *Gpi-A* (Figura 3 e Quadro 3).

No segundo agrupamento, as populações de Piranguçu, Monjolinho e Jaguari estão mais próximas, seguidas da população de Casca D'antas (Figura 4). Apesar das populações de Piranguçu e Monjolinho estarem muito próximas genética e geograficamente, morfologicamente, a população de Piranguçu é um tanto diferenciada, apresentando um corpo mais curto e robusto, cabeça mais larga e ausência de nadadeira adiposa, claramente contrastando com a população de Monjolinho (Figura 2; f, g). A população de Casca d'Antas também possui o corpo curto e cabeça larga (Figura 2; h), mas diferencia-se da população de Piranguçu por ter um pedúnculo caudal mais baixo e nadadeira adiposa reduzida, porém presente. Apesar de geograficamente próximas, as duas primeiras populações pertencem à bacia do rio Grande, enquanto as populações de Jaguari e Casca d'Antas encontram-se no rio Tiête. Neste caso, a topografia acidentada da Serra da Mantiqueira, região destas quatro populações, capturas de cabeceiras poderiam ser levantadas para explicar esta proximidade genética e morfológica.

As populações de Carandaí e Tamborete (Figura 2; c, d e Figura 4) também revelaram uma alta similaridade genética, porém com diferenças alélicas fixas para os loci *G31* e *Gpi-B*. A população de Tamborete habita riachos, drenando para o reservatório de Funil, nas proximidades da Serra da Canastra, no rio Grande, enquanto Carandaí habita as porções mais altas do rio Grande, em riachos de cabeceira afluentes do rio das Mortes.

A análise de dendogramas para diferenciação de espécies foi também relatado em estudos de Hermida et al. (2009), analisando 11 populações de *Salmon trutta* separadas espacialmente em duas linhagens, uma linhagem de origem (Pisuerga) e outra linhagem híbrida (Lower course), coletadas na bacia Duero na Península Ibérica. As análises demonstraram, a partir da análise de cluster associado

a análises de multivariância, a discriminação destas duas linhagens ocupando clados diferentes. Estes dados podem ser observados na construção de um dendograma usando o método Ward's method using Euclidean distance.

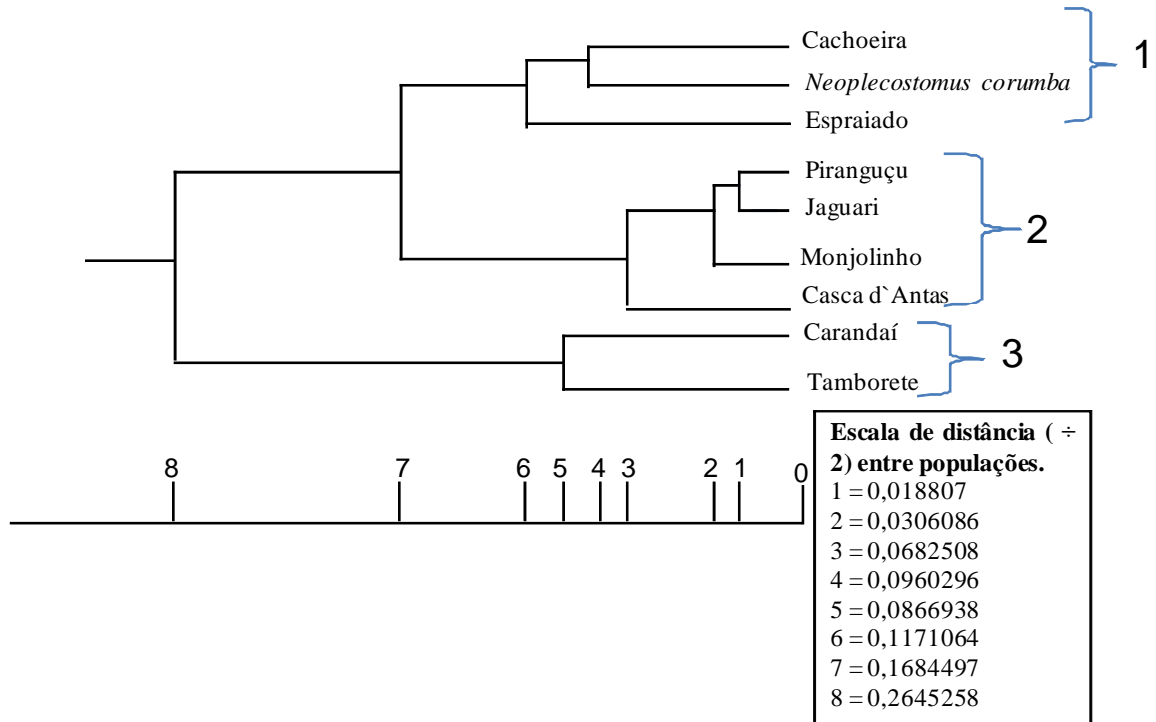


Figura 4 - Dendograma de UPGMA calculado a partir da distância genética de Nei (1978) entre as oito populações e *N. corumba*. Clados 1, 2 e 3.

Finalmente, pode-se observar que os métodos eletroforéticos e estatísticos foram válidos para diferenciar as populações de *Neoplecostomus* estudadas, assim como os resultados obtidos podem ser úteis quando associados a outras ciências, ajudando na elucidação de outras questões deste gênero.

5. CONCLUSÃO

As análises bioquímicas das oito populações de *Neoplecostomus* comparadas à espécie de *Neoplecostomus corumba* permitiram destacar as seguintes conclusões:

- a) Níveis consideráveis de diversidade genética entre *Neoplecostomus corumba* e as oito populações foram detectados, além de níveis variáveis de variabilidade genética dentro das populações, com exceção da população localizada em Casca D´Antas que não apresentou nenhuma variação;
- b) As diferenciações genéticas visualizadas, através da identidade genética e distâncias genéticas encontradas entre as populações, podem ser um forte indicativo da presença de pelo menos duas espécies diferentes de *Neoplecostomus corumba* nas regiões analisadas;
- c) Estudos adicionais, com um maior número de amostras das populações coletadas nas regiões de Carandaí, Casca D´Antas e Jaguari, seriam interessante para melhores confirmações dos resultados encontrados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, R.M. Structure and function in catfish. **Journal of Zoology**, 148:88-152, 1965.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 2006. 627p.
- ALVES, L.A.; OLIVEIRA C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostaminae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, 124:127-136, 2005.
- AMORIM, D.S. **Fundamentos de sistemática filogenética**. Riberão Preto: Holos, 2009. 154p.
- ARRATIA, G. Catfish head skeleton and the siluriform postcranial skeleton. In: ARRATIA, G.; KAPOOR, B.G.; CHARDON, M.; DIOGO, R. (eds.). **Catfishes**. Enfield (NH): Science Publisher, Inc, 2003. p. 1-30; p. 121-157.
- ARMBRUSTER, J.W.; SABAJ, M.H.; HARDMAN, M.; PAGE, L.M.; KNOUFT, J.H. Catfishes genus *Corymbophanes* (Loricariidae: Hypostominae) with description of one new species: *Corymbophanes kaiei*. **Copeia**, 4:997-1006, 2000.
- ARMBRUSTER, J.W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 141:1-80, 2004.
- AVISE, J.C. The systematic value of eletroforetic data. **Systematic Zoology**, 23:465-481, 1974.
- BIZZERIL, C.R.S.F. Description of a new species of *Hemipsilichthys* (Loricariidae: Hypostominae) from the state of Santa Catarina. **Acta Biologica Leopoldensia**, 17:115-122, 1995.

BORBA, E.L.; FELIX, J.M.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. *Pleurothallis fabiobarrosii*, a new Brazilian species: morphological and genetic data, and notes on the taxonomy of Brazilian rupicolous *Pleurothallis*. **Lindleyana**, 15:2-9, 2000.

BORBA, E.L.; FELIX, J.M.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J. Fly pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) have high genetic variability: evidence from isozyme markers. **American Journal of Botany**, 88:418-428, 2001.

BOUZA, C.; ARIAS J.; CASTRO, J.; SÁNCHEZ, L.; MARTINEZ, P. Allozymic evidence of parapatric differentiation of brown trout (*Salmon trutta*) within an Atlantic river basin of the Iberian Peninsula. **Molecular Ecology**, 10:1455-1469, 2001.

BRITTO, M.R. **Análise filogenética da ordem Siluriforme com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi)**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2003. 289p. Tese (Doutorado em Zoologia).

BRITSKI, H.A.; LANGEANI, F. *Pimelodus paranaensis*, sp. um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do alto Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoolologia**, 5:409-417, 1988.

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

BUSH, G.L.; CASE, S.M.; WILSON, A.C.; PATTON, J.L. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 74:3942-3946, 1977.

BUTH, D.G.; MURPHY, R.W. The use of isozyme characters in systematic studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, 27:117-129, 1999.

CHIACHIO, C.M.; OLIVEIRA, C.; BURGOS – MONTOYA, I.J. Molecular systematic and historical biogeography of the armored neotropical catfishes

Hypoptopomatinae and Neoplecostaminae (Siluriformes: Loricariidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49:606-617, 2008.

CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analyses. **Acta Scientiarum**, 23:445-451, 2001.

CRAMER, C.A.; LIEDKE, A.M.R.; BONATTO, S.L.; REIS, R.E. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. **Bulletin of fish Biology**, 9:51-59, 2007.

DOBZHANSKY, T.; AYALA, F.J.; STEBBINS, G.L.; VALENTINE, J.W. **Evolution**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1977. 572p.

EIGENMANN, C.H.; R. EIGENMANN. A revision of the South American Nemathognathe, or cat-fishes. **Occasional Papers of the California Academy of Science**, 1:1-508, 1890.

EIGENMANN, C.H. Catalogue of the fresh-water fishes of tropical and south temperate American: Reports of the Princeton University expeditions to Patagonia 1896-1899. **Zoology**, 3:375-511, 1910.

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

FERRARIS JR, C.J. Family Loricariidae: Subfamily Neoplecostominae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 319-320.

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

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 220p.
- FINK, S.V.; FINK, S.V. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 72:297-353, 1981.
- FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D, BURDON, J.J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 299p.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 632p.
- GOSLINE, W.A. Catálogo dos Nematognatos de água doce da América do Sul e Central. **Boletim do Museu Nacional de Zoologia**, 33:1-138, 1945.
- GOSLINE, W.A. Contributions to the classification of the loricariid catfishes. **Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, 41:79-134, 1947.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. Amsterdam: North Holland, 1976. 323p.
- HERMIDA, M.; MIGUEL, S.E.; BOUZA, C.; CASTRO, J.; MARTINEZ, P. Morphological variation in a secondary contact between divergent lineages of Brown trout (*Salmon trutta*) from the Iberian Peninsula. **Genetics and Molecular Biology**, 32:42-50, 2009.
- HOWES, G.J. The cranial muscle of loricarioid catfish their homologies and value as taxonomic characters (Teleostei: Siluroidei). **Buletin of the Bristish Museum (Natural History) Zoological Series**, 45:309-45, 1983.
- HUNTER, R.L.; MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, 125:1294-1295, 1957.

ISBRÜCKER, I.J.H. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Verslagen en Technische Gegevens**, 22:1-181, 1980.

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

KIRPICHNIKOV, V.S. **Genetic basis of fish selection**. New York: Springer-Verlag, 1981. 410p.

LANDE, R. Effectives deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. **Evolution**, 33:234-251, 1979.

LANGANI, F. Revisão do gênero *Neoplecostomus* Eigenmann & Eigenmann, 1888, com a descrição de quatro espécies novas do sudeste brasileiro (Siluriformes: Loricariidae). **Museu Ciências PUCRS, Série Zoologia**, 3:3-31, 1990.

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

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

MACHADO, M.F.P.S.; COLLET, S.A.O.; MANGOLIN, C.A. **Expressão gênica no desenvolvimento de tecidos vegetais *in vitro***. Maringá: EDUEM, 1999. 95p.

MAACK, R. **Geografia física do Paraná**. Curitiba: Imprensa oficial, 2002. 440p.

MARQUES, S.K.D. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 22p.

- MARTINEZ, P.; BOUZA, C.; CASTRO, J.; HERMIDA, M.; PARDO, B.G.; SÁCHEZ, L. Analysis of a secondary contact between divergent Atlantic mtDNA lineages of Brown trout (*Salmon trutta*) from Duero basin using microsatellites and mtDNA RFLPs. **Journal of Fish Biology**, 71B:195-213. 2007.
- MAYR, E. **Animal species and Evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1963. 797p.
- MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. Tradução: REICHARDT, H. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1977. 485p.
- MONTEIRO, R.; CARVALHO, C.; PEREIRA-COLLARES, M.J. Karyotype and genome size of *Iberochondrostoma almacai* (Teleostei, Cyprinidae) and comparison with the sister-species *I. lusitanicum*. **Genetics and Molecular Biology**, 2:268-275, 2009.
- MONTOYA-BURGOS, J.I.; MULLER, S.; WEBER, C.; PAWLOWSKI, J. **Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) basen on mitochondrial rRNA gene sequences**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p. 363-375.
- MONTOYA-BURGOS, J.I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, 12:1855-1867, 2003.
- MOYLE, P.B.; LEIDY, R.A. Loss of biodiversity in aquatic ecosystems: evidence from fish faunas. In: FIELDER, P.L.; JAIN, S.K. (eds.). **Conservation Biology: The Theory and Practice of Nature Conservation, Preservation and Management**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 127-169.
- MURPHY, R.W.; SITES JR.; J.W.; BUTH, D.G.; HAUFLE, C.H. Proteins: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (eds.). **Molecular systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 51-120.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, 106:238-292, 1972.

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

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

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

NEVO, E. Genetic variation in natural populations patterns and theory. **Theoretical Population Biology**, 13:121-177, 1978.

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

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

PAXTON, J.R.; ESCHMEYER, W.N. **Encyclopedia of fishes**. San Diego: Academic Press, 1998. 1192p.

PEREIRA, E.H.L.; REIS, R.E. Revision of the loricariid genera *Hemipsilichthys* and *Isbrueckerichthys* (Teleostei: Siluriformes), with description of five new species of *Hemipsilichthys*. **Ibiden**, 13:97–146, 2002.

PEREIRA, E.H.L.; OYAKAWA, O.T. *Isbrueckerichthys epakmos*, a new species of loricariid catfish from the Rio Ribeira do Iguape basin, Brazil (Teleostei: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**, 1:3–9, 2003.

PEREIRA, E.H.L. **Relações filogenéticas de *Neoplecostomus* Regan, 1904 (Siluriformes: Loricariidae)**. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2008. 282p. Tese (Doutorado em Biologia Animal).

PERES, M.D.; RENESTO, E. Genetic variability in a *Leporinus lacustris* Campos, 1945 (Osteichthyes: Anostomidae) population from Lagoa do Carão (Upper Paraná River floodplain), Brazil. **Acta Scientific Biology Science**, 27:79-84, 2005a.

PERES, M.D.; VASCONCELOS, M.S.; RENESTO, E. Genetic variability in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 28:717-724, 2005b.

PEYER, B. Über die Flossenstacheln der welse und Panzerwelse sowie des Karpfens. **Morphologic Jahrbuch**, 51:493-554, 1922.

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

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

REGAN, C.T. A monograph of the fishes of the family Loricariidae. **Zoological Society of London**, 7:191-324, 1904.

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

REIS, R.E.; PEREIRA, E.H.L.; ARMBRUSTER, J.A.W. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 147:277–299, 2006.

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

RICHARDSON, B.J.; BAVERSTOCK, P.R.; ADAMS, M. **Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies**. Sydney: Academic Press, 1986. 409 p.

SANTOS, M.R. **Variabilidade genética em *Oligosarcus paranensis* do rio São Francisco, bacia do Rio Ivaí Paraná- Brasil**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 46p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

SAVAGE, J.A. Systematics and biodiversity crisis. **Bioscience**, 45:637-679, 1995.

SCHAEFER, S.A. **Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogenetic analysis of the loricariids subfamilies (Pisces, Siluridei)**. Los Angeles: Natural history museum, 1987. 30p.

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

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

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, 6:629-641, 1955.

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

SOLÉ-CAVA, A.M.; THORPE, J.P. High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. **Biological Journal Linnean Society**, 44:65-80, 1991.

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

STEINDACHNER, J. Die Süßwasserfische des südöstlichen Brasilien (III). Sitzungsber. **Akademie der Wissenschaften in wien**, 74:559-694, 1876.

THORPE, J.P. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. **Annual Review of Ecology Systematic**, 13:139-168, 1982.

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

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

VALENCIENNES, L. **Histoire naturelle des poissons**. Paris: Levrault, 1840, 421-455 p.

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

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. Chicago: The University of Chicago Press, 1978. 465p.

YEH, FC.; YANG, R-C.; BOYLE, TBJ.; YE, Z-H.; MAO, JX. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. [1997]. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/faq.htm>> acesso em: 29, Abril, 2009.

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

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

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

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

ZAWADZKI, C.H.; PAVANELLI, C.S.; LANGEANI, F. *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper rio Paraná basin, Brazil, with description of three new species. **Zootaxa**, 1757:31-48, 2008.

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](#)