



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ALEXANDRE WAGNER SILVA HILSDORF

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO DNA MITOCONDRIAL EM POPULAÇÕES CULTIVADAS E SELVAGENS DA PIRAPITINGA-DO-SUL, *BRYCON OPALINUS* (CUVIER, 1819) (CHARACIFORME, CHARACIDAE, BRYCONIAE), NA BACIA DO PARAÍBA DO SUL**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Alexandre Wagner Silva Hilsdorf e aprovada pela Comissão Julgadora. 06/07/99 K-S

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger  
Co-Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marta Helena Krieger

9916283

Campinas – SP  
-1999-



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
	Ex.
P. Mar.	38573
PROG.	229199
	<input type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/08/99
N.º CPD	

CM-00125852-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

**Hiltdorf, Alexandre Wagner Silva**

**H546d** Diversidade genética do DNA mitocondrial em populações cultivadas e selvagens da Pirapitinga-do-sul. *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (*Characiforme. Characidae. Bryconinae*), na bacia do Paraíba do Sul/Alexandre Wagner Silva Hiltdorf. -- Campinas, SP:[s.n.], 1999.  
161f.:ilus.

Orientador: José Eduardo Krieger

Co-Orientadora: Marta Helena Krieger

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

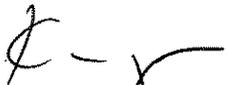
I. DNA mitocondrial. 2. Polimorfismo. 3. Genética de populações.  
4. Brycon. 5. Peixe. I. Krieger, José Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 06 / 07 / 99

**Banca Examinadora**

**Titulares:**

Prof. Dr. José Eduardo Krieger

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Antonio Mateo Solé Cava

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura

**Suplentes**

Prof. Dr. Marcio de Castro Silva

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## **Agradecimentos**

---

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger por acreditar, apoiar a concepção deste projeto e orientar-me no dia a dia de bancada.

À Prof. Marta Helena Krieger, minha co-orientadora e amiga, por tornar possível uma idéia.

À Maúde que me ensinou os primeiros passos do “mundo” da Biologia Molecular.

A todos amigos do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração: Renata, Ivy, Ayumi, Edilamar, Glória, Cláudia, Andréa, Giuliana, Thiago, Alexandrinho e Alberto, que participaram intensamente de meu dia a dia neste últimos anos.

À amiga Maria Luisa (Zizi) pela revisão do texto.

À colega Silvia pelas importantes dicas com os programas de avaliação genética populacional usados neste trabalho.

Ao colega Fumio pela paciência com minhas eternas dúvidas com computadores.

Aos colegas Rosana e Wagner de Souza pela permissão de uso dos mapas da bacia do Paraíba do Sul.

A todos funcionários da CESP, em especial, Lourenzo Girardi, Adão José Garcia, Benedito Barros e Danilo Caneppele pelos dias de “pescaria”, e sem os quais este trabalho teria sido muito mais difícil de ser realizado.

À CESP na pessoa do Eng. Eduardo Santarelli pelo apoio integral na condução do projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Universidade de Taubaté e ao Depto. de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP por apoiarem a realização deste trabalho.

---

Dedico este trabalho

À minha mãe, Helena, pela coragem e estímulo,

À minha esposa, Mônica, pelo companherismo e amor,

Ao meu Pai, Orlando, minha fonte eterna de força e determinação.

# ÍNDICE

## I. Introdução

1.1.1. Sobre a Ictio-diversidade	1
1.1.2. Impactos causados pela implantação de hidrelétricas	2
1.1.3. Medidas mitigadoras para conservação e proteção da ictiofauna	5
1.2. Aspectos biológicos do repovoamento	9
1.2.1. Populações, Estoques, Demes, Bancos e outras conceituações	9
1.2.2. Adaptações eco-fisiológicas em populações isoladas	11
1.2.3. Conservação da variabilidade intra-populacional no repovoamento	13
1.3. Ferramentas para avaliação da estrutura genético populacional	15
1.3.1. Da proteína ao DNA	15
1.3.2. O DNA mitocondrial	16
1.3.3. DNA mitocondrial no estudo populacional de peixes	20
1.4. Bacia hidrográfica do Vale do Paraíba	23
1.4.1. Evolução geológica e de relevo	23
1.4.2. Caracterização hídrica do Vale do Paraíba	24
1.4.3. Ictiofauna da bacia do Vale do Paraíba	27
1.5. Os Characiformes	29
1.5.1 <i>Brycon</i> – diversidade e caracterização	30
1.5.2. Importância econômica dos peixes do gênero <i>Brycon</i>	32
1.5.3- Estudos populacionais e filogenéticos	33

## II. OBJETIVOS

35

## III. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Origem dos peixes	36
3.1. Locais de coleta	36
3.1.1. Estoques nativos	37
3.1.2. Estoques introduzidos	39
3.1.3. Estoque em cativeiro	40

3.2. Preparação das amostras	48
3.2.1. Extração do DNA mitocondrial	48
3.2.2. Extração do DNA total	48
3.3. Obtenção de sondas do DNAMt da Pirapitinga-do-sul	49
3.3.1. Processo de purificação do DNAMt	49
3.3.2. Clonagem e transformação	52
3.3.3. Identificação dos clones positivos	53
3.3.4. Maxi-preparação do DNA plasmidial	54
3.3.5. Análise das enzimas informativas	54
3.4. Metodologia de análise	58
3.4.1. RFLP- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	58
3.4.2. Análise estatística	58
<b>IV. RESULTADOS</b>	
4.1. Avaliação e seleção das enzimas de restrição	61
4.2. Composição de haplótipos do DNAMt da Pirapitinga-do-sul	61
4.3. Freqüência e diversidade haplotípica e nucleotídica na Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna	71
4.4. Caracterização da diversidade do DNAMt das populações da Pirapitinga-do-sul na bacia do Paraíba do sul	72
4.5. Diversidade haplotípica e nucleotídica das populações selvagens da Pirapitinga-do-sul	83
4.6. Divergência genética entre populações e estrutura das populações	83
<b>V. DISCUSSÃO</b>	
5.1. Características do DNA mitocondrial da Pirapitinga-do-sul	89
5.2. Caracterização genética do estoque reprodutor da Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna - CESP	92
5.3. Variabilidade do DNAMt e estrutura genético populacional da Pirapitinga-do-sul na bacia do rio Paraíba do Sul	98
5.4. Polimorfismo do DNAMt e sua implicação para o manejo dos estoques selvagens e cultivados da Pirapitinga-do-sul.	105

<b>VI. CONCLUSÕES</b>	109
<b>VII. RESUMO</b>	111
<b>VIII. ABSTRACT</b>	113
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	115
<b>X. APÊNCIDES</b>	
10.1. Mapa do Estado de São Paulo com as cinco Estações de Hidrobiologia e Aqüicultura da CESP	143
10.2. Espécies produzidas pelas Estações Hidrobiologia e Aqüicultura da CESP	144
10.3. Foto da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul	145
10.4. Protocolos para extração de DNA mitocondrial e DNA total	146
10.5. Fórmulas utilizadas para análise genética	150

---

## FIGURAS

Figura 3.1. Mapa com locais de coletas na Bacia do Rio Paraíba do sul	42
Figura 3.2. Clonagem do plasmídeo <i>pBluescript<sup>®</sup> Amp SK(+)</i> ( <i>Stratagene</i> )	51
Figura 4.1. Autorradiograma das endonucleases <i>Apa</i> I e <i>Ava</i> II	65
Figura 4.2. Autorradiograma das endonucleases <i>EcoR</i> I e <i>Hind</i> III	66
Figura 4.3. Autorradiograma das endonucleases <i>Hpa</i> I e <i>Nhe</i> I	67
Figura 4.4. Diagrama de interconversão para <i>Apa</i> I, <i>Ava</i> II e <i>EcoR</i> I	69
Figura 4.5. Diagrama de interconversão para <i>Hinc</i> II, <i>Hpa</i> I e <i>Nhe</i> I	70
Figura 4.6. Freqüências dos haplótipos – rios Paraibuna e Martins	75
Figura 4.7. Freqüências dos haplótipos – rios Itagaçaba e Buquira	76
Figura 4.8. Freqüências dos haplótipos – rio Preto	77
Figura 4.9. Freqüências dos haplótipos – rios Negro e do Peixe	78
Figura 4.10. Freqüências dos haplótipos - Estação	79
Figura 4.11. Dendrograma (UPGMA) entre os haplótipos mitocondriais	81
Figura 4.12. Diagrama de parcimônia	82
Figura 4.13. Dendrograma (UPGMA) entre as populações	87

## FOTOS

Foto 3.1. Pirapitinga-do-sul ( <i>Brycon opalinus</i> )	43
Foto 3.2. Rio Preto, município de Visconde de Mauá (RJ)	44
Foto 3.3. Rio Paraibuna, município de São Luiz do Paraitinga (SP)	44
Foto 3.4. Rio Buquira, município de Monteiro Lobato (SP)	45
Foto 3.5. Rio Itagaçaba, município de Silveiras (SP)	45
Foto 3.6. Rio do Peixe, município de Natividade da Serra (SP)	46
Foto 3.7. Rio Negro, município de Paraibuna (SP)	46
Foto 3.8. Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura da UHE de Paraibuna	47

## **TABELAS**

Tabela 3.1. Período, local e quantidade de animais coletados	41
Tabela 3.2. Latitude e longitude dos locais de coleta da Pirapitinga-do-sul	41
Tabela 3.3. Listas de enzimas utilizadas	57
Tabela 4.1. Tamanhos dos fragmentos das enzimas de restrição	64
Tabela 4.2. Haplótipos do DNAm <sup>t</sup>	68
Tabela 4.3. Distribuição dos haplótipos	80
Tabela 4.4. Divergência nucleotídica entre todos os pares de haplótipos	85
Tabela 4.5. Índices de variabilidade das populações	86
Tabela 4.6. Análise da estrutura populacional pelo método AMOVA	88

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS

DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNAmt	Ácido desoxiribonucléico mitocondrial
EDTA	Tetracetato de etileno diamina
IPTG	<i>Isopropylthio-β-D-galactoside</i>
KCl	Cloreto de potássio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
pb	Pares de bases
kb	Quilobase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
TE	Tris EDTA
TAE	Tris-Acetato/EDTA
TEK	Tris-EDTA-KCl
STE	Tampão NaCl-Tris-EDTA
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SSC	NaCl-Citrato Tri-Sódio
UV	Ultra violeta
V	Volts
UHE	Usina hidrelétrica

# I. INTRODUÇÃO

## 1.1.1. Sobre a diversidade da ictiofauna

A perda da biodiversidade nos ambientes aquáticos está entre os mais sérios problemas enfrentados pelos países ao redor do mundo (ALM, 1991). Mais da metade (51,1%) de todos os vertebrados vivos são peixes, cerca de 24.618 espécies, destes 9.966 espécies (40,5%) habitam ambientes de água doce (Nelson, 1994).

A importância deste grupo de vertebrados não é apenas significativo pela quantidade de espécies existentes, mas também por sua contribuição como uma importante fonte de proteína para as populações humanas. Atualmente, o pescado representa 15% de toda proteína animal consumida no mundo. A produção mundial de pescado advindo da pesca e da aquicultura em 1996 foi de 90 milhões de toneladas, com uma projeção de demanda para o ano 2010 de 110 a 120 milhões de toneladas (FAO, 1997 e 1998).

Apesar da grande importância econômica que os peixes representam para o homem, ainda pouco se conhece sobre sua diversidade. De acordo com Groombridge, (1993) aproximadamente 4% (979 espécies) estão ameaçadas de extinção. Nos EUA, 45 % das espécies consideradas em perigo de extinção são aquáticas (Williams & Miller, 1990 e Beattie, 1994). Segundo Pullin, (1990), na América do Sul e na Ásia são 0,4% (12 de 2.700) e 1,3% (15 de 200), respectivamente. Estima-se que cerca de 20% da ictiofauna de água doce no

mundo está extinta ou em sério declínio (Moyle & Leidy, 1997). Contudo, este valor pode estar grosseiramente subestimado, fazendo dos peixes de água doce, o grupo, entre os vertebrados, mais ameaçado, depois dos anfíbios (Branch, 1994)

A diversidade biológica é fundamental para manutenção das espécies no que concerne à sua habilidade de adaptação e resposta às freqüentes mudanças ambientais. (Barker & Tingey, 1992). A perda da biodiversidade compromete o funcionamento dos ecossistemas, e a conservação de tais ecossistemas é de vital importância para vários setores econômicos em muitos países (Ehrlich & Ehrlich, 1992). De acordo com Bruton (1995) e Allan & Flecker (1993) vários têm sido os fatores identificados como causadores do declínio da diversidade de peixes nos vários ecossistemas aquáticos do planeta. Estes vão desde a deterioração dos ambientes aquáticos por poluição, assoreamento e barramento de rios, e pesca predatória até à introdução de espécies exóticas.

### **1.1.2. Impactos causados pela implantação de hidrelétricas**

De todas as formas de geração de energia elétrica – usinas termoelétricas, termonucleares e hidrelétricas – a última sempre foi considerada uma forma limpa de geração de energia sem produção direta de resíduos poluentes para o meio ambiente. Todavia, o represamento de um rio promove alterações drásticas no ecossistema aquático e terrestre em diferentes níveis (Gup, 1994).

A construção de grandes barragens para construção de hidrelétricas veio contribuir com o processo de deterioração do meio ambiente aquático, já em andamento pela poluição industrial e agrícola, desmatamento, entre outras intervenções humanas. De todos os impactos negativos sobre a ictofauna de água doce, a interrupção sucessiva dos rios para geração de energia elétrica parece ser um dos mais significativos.

A formação de reservatórios em hidrelétrica provoca inevitavelmente modificações no fluxo de água, sedimentos, nutrientes e energia do meio aquático, alterando significativamente a dinâmica dos processos hidrográficos de uma bacia (Cushman, 1985 e Ligon *et al.*, 1995). Segundo, Tundisi (1986) a interrupção do fluxo de um rio altera os processos de evolução e adaptação dos organismos aquáticos e exerce efeitos importantes sobre o ecossistema natural, tais como:

- ◆ Modificações do ciclo hidrológico e do balanço hídrico, impactos geofísicos decorrentes das modificações ocorridas no sistema terrestre, de sismos produzidos pela construção do reservatório ou do aumento da erosão;
- ◆ Impacto sobre o microclima regional e os sistemas aquáticos naturais (rios), em consequência das modificações no transporte de sedimentos e da má condutividade da água; aumento da superfície de evaporação;

- ◆ Impactos sobre a flora e a fauna terrestre e aquáticas, em razão do desaparecimento das matas ciliares, que são importantes sistemas de manutenção da diversidade; desaparecimento da fauna terrestre;
- ◆ Impactos sobre o homem e as atividades humanas, com alteração das vias terrestres de comunicação, desaparecimento de atividades agrícolas, modificações estéticas da bacia hidrográfica, submersão de sítios arqueológicos e necessidade de realocação de populações; alterações das condições sanitárias.
- ◆ Fonte de produção de gases que contribuem para o efeito estufa (Rudd *et al.*, 1993)
- ◆ Aumento nos níveis de toxicidade para fauna aquática com a produção metil mercúrio em reservatórios artificiais (Bodaly *et al.*, 1984).

Vários são os estudos sobre as conseqüências ambientais do represamento de rios para grandes projetos hidrelétricos na região tropical do globo (Szekely, 1982 e Lelek, 1984). A exploração do potencial hidrelétrico, encontrado na maioria das bacias hidrográficas brasileiras, tem sido alvo de questionamentos pela maneira com os quais alguns desses projetos, tais como a hidrelétrica de Tucuruí (Barrow, 1988) e Balbina (Fearnside, 1990) na Amazônia, têm sido conduzidos, no que se refere à questão ambiental.

Para a ictiofauna de um rio, a modificação do regime hídrico de um ambiente lótico para lêntico (água parada) acarreta uma série de modificações

nos rios. O desaparecimento de obstáculos naturais, importantes para reprodução de espécies migratórias (piracema); regularização da vazão do rio, importantes para o ciclo reprodutivo de espécies que desovam em ninhos (Bonetto, 1980); diminuição das vegetação ciliar dos rios, essenciais para a alimentação de diversas espécies de peixes (Machado, 1975) e o desaparecimento das lagoas marginais que funcionam como criadores naturais para eclosão de ovos e manutenção da fase juvenil de muitos peixes de piracema (Godoy, 1975) são algumas delas.

Estas modificações têm causado a redução de estoques de algumas espécies migratória (de piracema) de importância econômica no Brasil, como por exemplo, o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o Dourado (*Salminus maxillosus*) e o aumento de outros, como a Pirambeba (*Serrassalmus spilopleura*) e o Acará (*Geophagus brasiliensis*), além de alterações na distribuição das estoques (Torloni *et al.*, 1986).

### **1.1.3. Medidas mitigadoras para conservação e proteção da ictiofauna**

A construção de usinas hidrelétricas traz consigo a necessidade de ações mitigadoras que permitam reduzir os impactos sobre a ictiofauna durante e após a formação do reservatório. Diversas medidas têm sido tomadas para diminuição dos impactos e preservação da ictiofauna em rios interrompidos por barragens. Algumas estratégias, como escadaria de peixes, elevadores ou mesmo veículos que transportam os peixes, presos abaixo da barragem para o

reservatório e estações de reprodução de espécies nativas para repovoamento, têm sido testadas em várias usinas ao redor do mundo (Hildebrand *et al.*, 1980).

De todas as medidas para preservação da ictiofauna, a construção de escadas e o repovoamento são as mais conhecidas e utilizadas. No Brasil a primeira legislação referente à construção de escadas em barragens foi estabelecida pela Lei 2.250 de 28/12/1927 e regulamentada pelo Decreto no. 4.930, de 15/03/28. Esta primeira lei estabelecia ao proprietário da barragem a construção de escadas de peixes sem levar em conta as particularidades da bacia e a altura barragem. Em 1938, o Governo Federal editou o primeiro Código de Pesca no Brasil, com o decreto-lei 794, de 19/10/1938. Recentemente, a portaria no. 0001, de 04/01/1977, da SUDEPE - Superintendência do Desenvolvimento da Pesca (incorporada pelo IBAMA), que regulamentou o artigo 36 do Decreto-lei 221, de 28/02/67, conhecido como "Lei da Pesca", exige que qualquer entidade, que sob qualquer condição esteja envolvida na construção de barragens, deverá adotar sistemas ou métodos de proteção e conservação dos recursos biológicos aquáticos.

Torloni *et al.*, (1986) descreveram que, ao contrário do que se pensa, a interrupção do processo migratório dos peixes de piracema pelas barragens de hidrelétrica não é a principal razão da diminuição dos estoques. Diferentemente dos peixes anadromos, como salmões e trutas, que necessitam subir o rio até sua cabeceira para desovarem, os peixes de piracema dependem de alguns mecanismos complexos, como condições mínimas de temperatura da água, fotoperíodo, elevação do nível do rio, presença de lagoas marginais, ausência

de poluição e presença de matas ciliares. Desta forma, a construção de escada de peixes para algumas barragens torna-se desnecessária, dentro do ponto de vista de conservação de algumas espécies nativas, pois a transposição da barragem, via escada, de jusante (ambiente lótico com a presença de lagoas marginais junto aos tributários) a montante, faria com que os peixes entrassem em um regime de águas lânticas, perdendo, assim, o estímulo a reprodução.

Levantamentos de biologia pesqueira realizados pelo Departamento de Meio ambiente da CESP (Torloni *et al.*, 1986), mostraram que diversas espécies de Piracema, como Dourado (*Salminus maxillosus*), Curimatá (*Prochilodus lineatus*), Piaparas (*Leporinus elongatus* e *L. friderici*) e Piavas (*Schizodon borelli*), vêm se reproduzindo nos reservatórios (principalmente de Promissão) e no rio Tietê (interrompido por 5 barragens), ao longo de seus tributários. Isto demonstra a adaptação destas espécies aos ambientes lânticos. Como próprio Torloni *et al.*, (1986) afirmam: “o Estado de São Paulo não possui mais grandes rios e sim grandes reservatórios, sendo a CESP responsável por 550.000 ha. de área alagada que necessitam ser administrados como tal”.

---

Em 1978 a CESP criou o Departamento de Recursos Naturais, que estabeleceu como medida de proteção e conservação dos recursos ictíios a construção de estações de piscicultura. O programa inicial foi desenvolvido sem o conhecimento das características limnológicas, ictiológicas e pesqueiras dos reservatórios, necessárias para o sucesso em programas que visam a conservação da biodiversidade e o incremento da produção pesqueira. No seu início o programa de repovoamento desenvolvido pela CESP teve como

estratégia, a produção e introdução de alevinos de espécies alóctones, como Sardinha (*T. angulatus*), Apaiari (*A. ocellatus*), Pescada (*P. squamosissimus*), Trairão (*H. lacerdae*); exóticas como Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), Carpa (*Cyprinus carpio*) e aquisição de ovos embrionários de Truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) para posterior peixamento (Silva *et al.*, 1997).

A partir de 1980, a CESP adotou a política de povoamento e repovoamento de alevinos de espécies autóctones de piracema, como Curimatá (*Prochilodus lineatus*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Piaparas (*Leporinus elongatus* e *L. obtusidens*), Piava-três-pintas (*Schizodon borellii*) nos reservatórios dos rios Tiête, Paranapanema, Paraná e Grande; Pirapitinga-do-sul (*Brycon opalinus*) e Piabanha (*Brycon insignis*) na bacia do Paraíba do Sul cuja produção substituiu a de espécies alóctones e exóticas.

Desde 1986 a CESP iniciou a implantação de um programa de manejo pesqueiro, que tem objetivado a manutenção da diversidade ictíica e conseqüente exploração racional dos recursos aquáticos, por meio da pesca, em seus reservatórios. Cinco estações de aquicultura – Jupiá (Bacia do rio Paraná); Promissão (Bacia do Rio Tietê); Salto Grande (Bacia do Rio Paranapanema); Paraibuna (Bacia do Rio Paraíba do Sul) e Barra Bonita (Bacia do rio Tietê) foram estabelecidas, tornando-se centros de desenvolvimento de técnicas de reprodução de espécies autóctones (Apêndice 1), e de estudos ictiológicos e limnológicos dos reservatórios. Esta estrutura vem possibilitando a produção de alevinos para programas repovoamento (Apêndice 2), visando a manutenção e ampliação dos estoques de peixes (Machado, 1975).

Atualmente, 75% dos alevinos produzidos nas Estações de Hidrobiologia e Aqüicultura da CESP são usados nos programas de repovoamento e os restantes 25% são disponibilizados para venda a proprietários rurais e doação a programas de cunho social. Desta forma, com a construção de barragens para geração de energia elétrica torna-se necessário o conhecimento dos aspectos biológicos dos ecossistemas antes, durante e principalmente após o enchimento do reservatório, objetivando, assim, a mitigação dos impactos ambientais e sociais oriundos da implantação de hidrelétricas (Mattos *et al.*, 1997).

## **1.2. Aspectos biológicos do repovoamento**

### **1.2.1. Populações, Estoques, Demes, Bancos e outras conceituações.**

A conservação de um determinado recurso biológico aquático requer o conhecimento de variáveis fisiológicas, comportamentais e ecológicas, que são importantes na determinação de como uma dada população sobrevive e se reproduz em diferentes ambientes (Danzmann *et al.*, 1991). Um dos pontos centrais destes fatores é o entendimento da estrutura populacional da espécie para que se determine, tanto as respostas fisiológicas às variações ambientais como as estratégias de manejo das populações naturais (Ryman & Utter, 1987).

O conceito de populações locais, subpopulações, estoques ou demes (Dizon *et al.*, 1992) pode diferir em relação ao grau de homogeneidade genética, importância quanto ao isolamento reprodutivo e ao potencial para a

exploração (Gulland, 1969; Smith *et al.*, 1990). No caso de recursos pesqueiros o conceito de população local se complica ainda mais por fatores políticos, econômicos e sociais.

Uma abrangente definição de populações locais foi proposta por Ihssen *et al.*, (1981), que descreveram uma população local como “um grupo intraespecífico de indivíduos que se reproduz ao acaso com integridade espacial e temporal”. Esta definição, quando aplicada a um recurso biológico potencialmente explorável, com baixo grau de integridade, as diferenças genéticas e fenotípicas entre as populações não são levadas em consideração. Assim, neste caso, as populações abrangem apenas os indivíduos cuja abundância depende das taxas de recrutamento e mortalidade. Já o conceito populacional, dentro de um ponto de vista genético, atribui a tal unidade biológica um alto grau de integridade que leva em consideração o isolamento reprodutivo, diferenciação genética de outras populações, especialização ecológica e adaptação local.

Desta forma, o conceito de população descrito por Ihssen *et al.*, (1981) pode ser interpretado de acordo com o manejo a ser implementado, aqui especificamente, sobre um recurso biológico aquático. Por um lado, temos uma estratégia a curto prazo cuja preocupação básica é a manutenção do recurso, evitando sua redução pelo excesso de captura; por outro, temos uma estratégia de conservação a longo prazo, que leva em consideração a diversidade genética dentro e entre populações.

Os fatores que determinam o isolamento genético de uma determinada população dependem de forças evolutivas, como seleção natural, fluxo gênico, deriva genética, mutações e o tempo viável para que estes processos ocorram (Chakraborty & Leimar, 1987). No caso de peixes, a estrutura genética dentro e entre populações é influenciada principalmente pelo fluxo gênico e tamanho populacional efetivo (Gyllensten, 1985).

### **1.2.2. Adaptações eco-fisiológicas em populações isoladas**

Entre os vertebrados, os peixes são os que melhor exibem a capacidade de se adaptarem às variações ambientais. Esta enorme plasticidade pode ser explicada pela capacidade com que a expressão do material genético pode se adaptar de acordo com as mudanças ambientais.

A grande diversidade de peixes em ambientes aquáticos diversos, também requer diferentes estratégias evolutivas. Isto pode ser observado pela facilidade com que peixes formam híbridos interespecíficos, o que permite um maior fluxo das informações genéticas e a sobrevivência de espécies com características muito semelhantes às de seus ancestrais (Almeida-Val, 1990).

Os fatores de estresse, isto é, qualquer condição que perturbe o equilíbrio homeostático do indivíduo nas condições em que este se encontra, desencadeiam respostas fisiológicas e comportamentais que possibilitam ao indivíduo compensar tais modificações. As respostas fisiológicas podem ser determinadas por um fator de estresse específico ou por um conjunto não específico de fatores. Quando uma população de peixes está submetida à um

intensivo e contínuo estresse, uma possível resposta a este estresse está relacionada à diminuição de seu valor adaptativo o que pode afetar o crescimento, reprodução e comprometer a sobrevivência da população (Bonga, 1997).

Ambientes aquáticos podem ser altamente variáveis, tanto no espaço como no tempo. Uma mesma espécie pode estar ocupando áreas sujeitas a pressões diferentes resultantes de flutuações naturais ou mesmo influências antropogênicas. O estudo das respostas adaptativas requer análises comparativas da espécie nos diferentes ambientes em que ela está distribuída.

Iwama *et al.*, (1992) observaram diferentes respostas de subpopulações de Salmão Coho (*Oncorhynchus kisutch*) a fatores de estresse - salinidade, baixo pH, doenças e manejo - o que possibilitou concluir que cada subpopulação possui uma base genética que as diferenciam quanto aos fatores testados. Variedades isoladas de Truta (*Salvelinus namaycush*) apresentaram diferenças nas concentrações de cortisol, glicose, sódio e cloro, quando em confinamento (McDonald & Robinson, 1993).

---

Na bacia Amazônica a plasticidade fenotípica em alguns peixes é bem evidente. Os diversos ecossistemas presentes nos rios da Amazônia exercem pressões seletivas diferenciadas que possibilitam o desenvolvimento de adaptações fenotípicas a tais mudanças. O Tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma destas espécies em que as adaptações a ambientes hipóxicos são bastante evidentes (Almeida-Val, 1986).

Desta forma, evidências da ampla plasticidade fenotípica correlacionada à distribuição de uma espécie de peixe nos diversos ecossistemas pode ser avaliada por sua estrutura genético populacional e deve ser considerada uma etapa importante no estudo das diferentes estratégias eco-fisiológicas de adaptação.

### **1.2.3. Conservação da variabilidade genética intra-populacional no repovoamento**

O objetivo de um programa de repovoamento é reverter o declínio e distribuição de um determinado recurso biológico que tenha sido afetado por ações antropogênicas. Assim, a reintrodução de uma espécie de peixe e a sua auto-manutenção requer que as populações mantenham sua diversidade genética, necessária às possíveis mudanças adaptativas dos indivíduos (Guerrant, 1996).

Desta forma, a principal questão quanto à efetividade de um programa de repovoamento de peixes está relacionada à adaptação dos indivíduos reintroduzidos ao ambiente, e se os mesmos estarão aptos o suficiente para dar continuidade ao processo de reprodução e manutenção da variabilidade genética da espécie. No Brasil, os programas de repovoamento realizados pelas companhias hidrelétricas não têm levado em consideração a integridade genética das populações locais, muitas vezes mantendo os estoques doadores em cativeiro, sem conhecimento prévio da origem genética de tais indivíduos.

Os projetos de repovoamento, visando a conservação de espécies, devem considerar estratégias de conservação a longo prazo, pois a recuperação genética de determinadas espécies depende, não somente do grau de conhecimento da variabilidade dentro de uma população, mas também das diferenças entre populações dentro de uma mesma bacia e entre bacias hidrográficas diferentes. Peixes com baixa taxa de migração podem apresentar maiores diferenças genéticas entre populações de uma mesma bacia. Já peixes com comportamento migratório, como é o caso de grande maioria das espécies brasileiras, apresentam grandes diferenciações genéticas entre diferentes bacias (Toledo-Filho *et. al.*, 1992). Desta forma, o manejo adequado das populações em ambientes naturais depende do entendimento da quantidade e distribuição da variação genética, dentro e entre populações (Ryman, 1991).

Quando uma dada espécie está estruturada em populações geneticamente distantes, estas devem ser consideradas separadamente como unidades de manejo (Moritz, 1994). As pressões ambientais podem estar selecionando diferentemente as freqüências alélicas e genotípicas adaptando a população às condições locais. Assim, a manutenção dos vários níveis de similaridades e/ou diferenças entre populações são importantes, pois permitem minimizar os efeitos da consangüinidade por intermédio de cruzamentos entre populações geneticamente diferentes.

### **1.3. Metodologias moleculares utilizadas para avaliação da estrutura genético populacional**

#### **1.3.1. Da proteína ao DNA**

A utilização de marcadores genéticos em Ictiologia remonta do final da década de 50, a partir do uso da eletroforese em gel de amido. Esta técnica possibilitou o estudo genético de peixes, baseado na mobilidade isoelétrica de hemoglobinas e transferrinas (Sick, 1961).

A técnica simples e o baixo custo fizeram da eletroforese de proteínas uma ferramenta muito utilizada para a caracterização genética de populações. Os marcadores isoenzimáticos têm permitido evidenciar marcadores genéticos para discriminação de populações de peixes, por meio de comparações entre suas freqüências alélicas, tanto em ambiente natural como em cultivo (May & Krueger, 1990, Grant, 1984 e Revaldaves *et al.*, 1997).

O desenvolvimento de técnicas no campo da biologia molecular vem evidenciando uma variedade de marcadores genéticos no DNA. A extensa variação contida no DNA nuclear de peixes (Franck *et al.*, 1991) tem sido usada em estudos que objetivam: o entendimento da estrutura genético populacional (Bielawski & Pumo, 1997), estudos filogenéticos (Murata *et al.*, 1993), avaliação da variabilidade de estoques cultivados (Coughland *et al.*, 1998) e “*Mixed Stock Analysis*” (MSA) (Utter & Ryman, 1993); esta última uma técnica importante para identificação dos estoques contribuidores para um determinado esforço de pesca.

### 1.3.2. O DNA mitocondrial

Além da variação encontrada no DNA nuclear, as informações contidas no DNA mitocondrial (DNAMt) são hoje freqüentemente utilizadas como uma das primeiras metodologias para estudos sobre a estrutura genética populacional e para o conhecimento das relações filogenéticas inter e intraespecíficas em diversos taxons (Avise, 1994).

Mitocôndrias são organelas presentes em todas as células eucariontes aeróbicas, e são responsáveis pelo processo de fosforilação oxidativa para geração de ATP, com a utilização do oxigênio como aceptor terminal de elétrons. Como em cloroplastos, as mitocôndrias possuem sua própria maquinaria para produção das proteínas.

O DNA contido nas mitocôndrias de animais é considerado como um marcador genético de extrema eficiência por sua estrutura simples, de fácil isolamento e manipulação. As propriedades moleculares do DNAMt animal foram amplamente revisadas por Avise & Lansman (1983), Brown (1983) e Brown (1985). Porém, apesar da extensa distribuição e importância evolutiva dos peixes, o DNAMt desse grupo de vertebrados tem sido um dos menos estudados quanto à sua organização (Meyer, 1994).

O DNAMt em peixes apresenta tamanho médio de 16.500 ( $\pm 500$ ) pb. O genoma mitocondrial codifica 13 proteínas, 2 RNA ribossômicos, 22 RNA transportadores (Meyer, 1993). Além desses 37 genes, há uma região conhecida como *D-Loop* (*Displacement Loop*) que controla a replicação e

transcrição do DNAm (Clayton, 1991). O *D-loop* é a região que possui a maior taxa de substituição de nucleotídeos, tendo, por isso, uma taxa evolutiva de 2 a 5 vezes maior do que as outras regiões codificadoras do DNAm (Aquadro & Greenberg, 1983). Em peixes, o *D-Loop* é altamente variável em tamanho, mesmo entre espécies taxonomicamente próximas. Isto se deve à presença das chamadas “Seqüências Repetidas em Conjunto ou em *Tandem*” e grandes inserções que surgem durante a replicação. Também em peixes são verificadas os “Blocos de Seqüências Conservadas” (CSB-D), comuns em outras ordens taxonômicas (Lee, W-J *et al.*, 1995).

Em peixes, como em outros vertebrados (Desjardins & Morais, 1991 e Pääbo *et al.*, 1991), a estrutura e a ordem dos genes são altamente conservadas. Esta afirmativa pode ser verificada nos diferentes genomas mitocondriais de peixes com suas seqüências de nucleotídeos inteiramente determinadas:

Espécie	Nome comum	Tamanho (pb)	Referência
<i>Gadus morhua</i>	<i>Atlantic Cod</i>	16.697	Johansen <i>et al.</i> , 1990
<i>Crossostoma lacustre</i>	<i>Stream loach</i>	16.558	Tzeng <i>et al.</i> , 1992
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa comum	16.575	Chang <i>et al.</i> , 1994
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta arco-íris	16.660	Zardoya <i>et al.</i> , 1995
<i>Protopterus dolli</i>	<i>Lungfish</i>	16.646	Zardoya & Meyer, 1996
<i>Polypterus ornatipinnis</i>	<i>Bichirs</i>	16.624	Noack <i>et al.</i> , 1996
<i>Latimeria chalumnae</i>	Celacanto	16.407	Zardoya & Meyer, 1997
<i>Scyliorhinus canicula</i>	<i>Dogfish</i>	16.697	Delarbre <i>et al.</i> , 1998

Como em outros genomas mitocondriais, o DNAm animal é considerado um genoma haplóide, sem recombinação (Hayashi *et al.*, 1985). As regiões codificadoras de proteínas não contém íntrons, e os genes são geralmente separados por menos de 10 pb (Attardi, 1985). Em um mesmo organismo é geralmente encontrado apenas um tipo de DNAm, condição conhecida como homoplasmia. Heteroplasmia, isto é, mais de um tipo de DNAm em um mesmo organismo, por sua vez, não é uma condição encontrada com frequência em estudos do genoma mitocondrial em animais. Em peixes, heteroplasmia de tamanho de molécula tem sido observada com maior frequência que a de sítio de restrição (Billington & Herbert, 1991).

Na grande maioria dos casos o DNAm é exclusivamente de herança materna (Awise & Vrijenhoek, 1987, Giles *et al.*, 1980), sendo o DNAm paterno degradado após a fertilização (Vaughn *et al.*, 1980, Hopkin, 1999). Algumas exceções ao modo de herança maternal do DNAm foram já observadas em ratos (Gyllensten *et al.*, 1991) e drosófilas (Kondo *et al.*, 1990). Porém, mesmo em moluscos do gênero *Mytilus*, em que a herança paterna do DNAm é bastante comum (Zouros *et al.*, 1992 e Sutherland *et al.*, 1998) não há evidências que o DNAm de origem paterna e materna se recombinem na progênie (Hoeh *et al.*, 1991). Assim, apesar da herança maternal, em estudos filogenéticos e populacionais, representar apenas uma parte da história evolutiva da espécie, as análises com base em diferenças entre moléculas de DNAm podem refletir a evolução da espécie, sem o problema da mistura e recombinação de dois genomas parentais (Luo *et al.*, 1995).

Uma outra característica importante do DNAm para estudos populacionais e filogenéticos está relacionado à sua rápida taxa de evolução. Estudos com o seqüenciamento do DNAm (Brown *et al.*, 1982) indicam que a evolução do DNAm é cerca de 5 a 10 vezes mais rápida, quando comparada com o DNA nuclear de cópia única (Brown *et al.*, 1979). Em *Drosófilas*, contudo, a taxa de evolução do DNAm e do DNA nuclear de cópia única (scnDNA) não diferem significativamente (Powell, 1997).

As regiões do DNAm possuem taxas mutacionais diferenciadas. Adições e deleções são muito comuns na região do *D-loop*, e em alguns casos em espaços inter-genes. Não é comum se verificar este tipo de mutação em regiões codificadoras de proteínas. A rápida evolução do DNAm pode ser explicada pela alta taxa de substituições de nucleotídeos (Greenberg *et al.*, 1983). Estas mutações pontuais são principalmente do tipo Transições ( $A \leftrightarrow G$ ;  $C \leftrightarrow T$ ) que sobrepõem significativamente as Transversões ( $A \leftrightarrow C$ ;  $A \leftrightarrow T$ ;  $G \leftrightarrow C$ ;  $G \leftrightarrow T$ ) em qualquer uma das posições dos códons em todas as regiões do DNAm. Esta predominância de transições parece ser a responsável pelo tempo e modo de evolução do DNAm (Meyer, 1993). Evolução esta que faz do DNAm uma molécula de alta resolução para estudos genético-populacionais (Stoneking *et al.*, 1991).

### 1.3.3. DNA mitocondrial no estudo populacional de peixes

Os impactos ambientais ocasionados por ações antropogênicas vêm acirrando as discussões sobre a conservação dos recursos biológicos aquáticos em diversas partes do mundo. Como no Brasil, países com recursos hídricos extensos têm como principal fonte de energia elétrica a formação de reservatórios para implantação de hidrelétricas (Lee, 1989). O uso de estações de produção de alevinos para repovoamentos tem sido uma das medidas mais difundidas e debatidas na conservação das populações de peixes afetadas pela construção de barragens (Daley, 1993; Rinne *et al.*, 1986).

A conservação da diversidade genética é reconhecidamente um objetivo importante para preservação de plantas e animais (Knutson & Stoner, 1989), e para o sucesso de programas com reprodução de espécies ameaçadas ou em perigo de extinção (Cohen, 1990). Da mesma forma, em programas de repovoamento de peixes há a necessidade de assegurar a manutenção da diversidade genética dos estoques de reprodutores, de acordo com a estrutura genético-populacional da espécie no meio ambiente (Gjedrem, 1992).

A análise da diversidade do DNAm<sub>t</sub> por *RFLP* tem sido usada extensivamente como uma entre as diversas ferramentas para a análise e compreensão da estrutura genética populacional de peixes (Ferris & Berg, 1987). Danzmann *et al.*, (1991) utilizaram o *RFLP* do DNA mitocondrial para discriminar populações selvagens e de estações de produção de alevinos de *Brook charr* (*Salvelinus fontinalis*). O uso de marcadores baseados no DNAm<sub>t</sub>, possibilitou determinar o grau de sucesso reprodutivo e competitividade de

populações de *Brook charr*, provenientes de estações de produção de alevinos introduzidas no meio ambiente.

Ferguson *et al.*, 1993 analisaram a variação do DNAm de *lake sturgeon* (*Acipenser fulvescens*) na Bacia do rio Moose - Canadá. O trabalho teve como objetivo avaliar os fatores antropogênicos que poderiam estar influenciando a distribuição populacional do *lake sturgeon* na bacia em questão. A técnica do *RFLP*, com a análise de 40 enzimas de restrição, foi usada, no entanto, não foi detectada heterogeneidade na frequência de haplótipos de exemplares capturados em diferentes localidades, incluindo aquelas separadas por barragens de hidrelétricas. Os resultados demonstraram a existência de um intenso fluxo gênico que impede a estruturação e distribuição dos haplótipos.

Na bacia hidrográfica do rio Colorado no oeste dos Estados Unidos, Dowling *et al.*, (1996) analisaram uma espécie endêmica, *Xyrauchen texanus* (*Razorback sucker*), em perigo de extinção devido à predação e a outros fatores de degradação ambiental. Aqui, também, o *RFLP* do DNAm foi usado para avaliar a variabilidade genética dentro da estação de produção de alevinos e sua comparação com o reservatório formado pela construção de uma barragem. No estudo em questão o DNAm mostrou uma diversidade mitocondrial alta no meio ambiente e em duas classes anuais, contudo, a composição dos haplótipos do ambiente natural foi diferente quando comparada à da estação. Os resultados obtidos possibilitaram o desenvolvimento de estratégias de repovoamento visando assegurar um maior recrutamento da espécie e conseqüente aumento populacional.

Os *RFLP* do DNAmT na avaliação de populações de *Walleye* (*Stizostedion vitreum*) têm sido utilizados para obter informações sobre a sobrevivência e sucesso reprodutivo, a longo prazo, de peixes reintroduzidos no meio ambiente (Billington & Herbert, 1988, Billington *et al.*, 1992 e Billington & Maceina, 1997). O conhecimento da estrutura populacional por *RFLP* do DNA mitocondrial também foi evidenciada para três espécies de trutas, truta do lago - *Salvelinus namaycush* (Grewe & Hebert, 1988), truta arco-íris - *Oncorhynchus mykiss* (Danzmann *et al.*, 1993) e truta marron - *Salmo trutta* (Hansen *et al.*, 1997), como auxílio para programas de repovoamento.

Populações naturais de um grupo de espécies tropicais importantes para pesca e cultivo na China foram avaliadas por *RFLP* do DNAmT em 365 indivíduos amostrados no rio Yangtze. São elas: Carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), Carpa capim (*Ctenopharyngodon piceus*), Carpa cabeça grande (*Aristichthys nobilis*) e Carpa negra (*Mylopharyngodon piceus*). A diversidade do DNAmT foi alta nas populações de carpas prateadas, cabeça grande e negra, e baixa em carpa capim. As análises mostraram que as populações estão estruturadas geneticamente e devem ser manejadas como unidades separadas, para fins de conservação (Lu *et al.*, 1997).

Grande parte das publicações com o uso do *RFLP* do DNAmT em peixes concentra-se em espécies de água doce. Porém, estudos genéticos populacionais com espécies de ambiente marinho têm estado cada vez mais presentes na literatura (Awise, 1985, Heist *et al.*, 1996, Tabata & Mizuta, 1997).

## 1.4. Bacia Hidrográfica do Vale do Paraíba

### 1.4.1. Evolução geológica e de relevo

A evolução geológica da bacia do Paraíba do Sul parece ter se iniciado após o Jurássico superior (Almeida, 1971). Isto é corroborado pela presença nesta bacia de rochas cristalinas do grupo Açungui, que são originárias do ciclo tectônico conhecido como Ciclo Brasileiro, ocorrido do Pré-Cambriano superior ao Cambro-Ordoviciano (entre 900 e 450 milhões de anos).

No Jurássico superior um novo ciclo se iniciou, caracterizado pelo início da separação da África e da América do sul, processo conhecido como Reativação Wealdeniana (Pitman *et al.*, 1993). Este período se prolonga até o Terciário e afeta grande parte da Plataforma Brasileira. A partir do Eoceno, há aproximadamente 54 milhões de anos, um período de calma tectônica possibilitou o surgimento de um extenso aplainamento, denominado superfície do Japi (Almeida, 1964). Após o surgimento da superfície do Japi, inicia-se um movimento vertical de abatimento de blocos que deu origem ao chamado *graben* (blocos baixos) do Paraíba, à escarpa da Serra do Mar e à bacia de São Paulo.

O relevo da área da bacia do Vale do Paraíba é dividido em unidades geomorfológicas maiores que consideram os elementos morfo-estruturais e morfoclimáticos. Na bacia do Paraíba encontramos as seguintes zonas:

### **Planalto da Bocaina**

Compreende as regiões serranas que separam os planaltos isolados, formando duas subzonas: Planaltos isolados, com amplitudes locais de 200 a 600 metros e declividades de mais de 30%, e Serrania da Bocaina, com relevo de serras alongadas e declividade alta.

### **Planalto do Paraitinga**

Esta é uma zona constituída por elevado planalto cristalino com altitudes de 600 a 1.300 metros. É drenado pelo rio Paraíba e seus formadores, a montante de Guararema. O relevo do Planalto do Paraitinga é formado por regiões de serras e áreas de morros, podendo ser diferenciado por três subzonas: Serranias de Natividade e Quebra-Cangalha, Morraria do Paraibuna e Morraria do Paraitinga.

#### **1.4.2. Caracterização hídrica do Vale do Paraíba**

O Vale do Paraíba está inserido na região sudeste do estado de São Paulo, até parte do Rio de Janeiro (Apêndice 3). É uma região de características agrícolas que, após a década de 50, conheceu um grande desenvolvimento industrial, principalmente na área compreendida pelo médio Vale do Paraíba, onde estão localizadas algumas cidades importantes como Guaratingetá, Taubaté e São José dos Campos. A região denominada de Alto Vale do Paraíba situa-se na área que interliga o médio Vale ao litoral. Esta ainda permanece, fundamentalmente, com atividades agro-pastoris, com

algumas cidades importantes como Paraibuna, São Luiz do Paraitinga e Cunha. A bacia hidrográfica coberta pelo rio Paraíba se estende por 57.000 km<sup>2</sup>, sendo 13.400 km<sup>2</sup> em território paulista.

O rio Paraíba do Sul possui 800 km de extensão e é o principal curso d'água da bacia do Paraíba. Este nasce no município de Paraibuna a partir da confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna (Deffontaines, 1945), e flui em vale acidentado em direção sudoeste. Porém, devido aos maciços graníticos da região de Guararema, inverte em 180° seu rumo para nordeste indo desaguar no Oceano Atlântico, em Atafona, RJ (Long, 1953). Este curso atípico levantou algumas hipóteses sobre a possibilidade das bacias do Paraíba e do Tiête terem tido algum tipo de conexão no passado. Assim, os rios Paraibuna e Paraitinga teriam sido parte do sistema de contribuição do rio Tietê (Ad'Saber, 1957).

Um dos formadores do rio Paraíba, o Paraitinga nasce na serra do mar, mais especificamente na Serra da Bocaina, a uma altitude de 1.800 m. A micro-bacia do rio Paraitinga cobre uma superfície de 2.500 km<sup>2</sup> e corre por aproximadamente 200 km, por um vale estreito e profundo, e de declividade fraca. Já o rio Paraibuna nasce na Serra de Parati, a sudeste da cidade de Cunha, a uma altitude de 1,600 m. Sua bacia cobre uma área de 1.900 km<sup>2</sup> e o rio percorre 140 km paralelamente à costa perto da serra do mar.

Ao longo do rio Paraíba podem ser evidenciadas características distintas que permitem separá-lo em dois grandes cursos (Guimarães, 1943):

**Curso Superior** - este trecho vai desde as nascentes até a região de Guararema, esta parte do rio Paraíba possui relevo bastante acidentado, com desníveis que chegam a atingir 5 m/km.

**Curso Médio** - neste trecho, que vai de Guararema a Itaocara, já no Rio de Janeiro, o curso do Paraíba possui uma declividade média de 0,19 m/km, apresentando-se bastante sinuoso.

Como podemos observar os rio formadores do Paraíba e seus afluentes de menor porte atravessam no seu curso superior terrenos estreitos e acidentados, que cortam parte da Serra do Mar. Ao atingir a cidade de Jacareí, o rio Paraíba alarga-se e atravessa uma longa planície de várzeas que vai até a cidade de Cachoeira.

Em meados da década de 70, entrou em funcionamento a Usina Hidroelétrica de Paraibuna. O reservatório de Paraibuna foi formado pela construção de duas barragens, uma de 94 m de altura que barrou o rio Paraibuna e outra de 104 m que barrou o rio Paraitinga, ambas inundando uma área de 206 km<sup>2</sup>. A bacia de contribuição do reservatório de Paraibuna está inserida entre o Médio Vale do Paraíba (a noroeste) e a zona litorânea (a sudoeste). Esta bacia cobre uma área de 4.100 km<sup>2</sup>, e tem como principais contribuidores os rios Paraitinga e Paraibuna. Desta forma, o rio Paraíba, que antes nascia da junção natural dos rios Paraibuna e Paraitinga, atualmente,

possui sua nascente exatamente na Hidrelétrica de Paraibuna, devido à formação do reservatório

### **1.4.3. Ictiofauna da Bacia do Vale do Paraíba**

“O rio Paraíba e seus afluentes é considerado um dos mais piscosos do Estado de São Paulo”. Esta afirmação está descrita em trabalho publicado em 1952 por Machado & Abreu, que destaca o importante núcleo de pescadores profissionais “Colônia Z-11 - Emílio Varoli”, com sede em Pindamonhangaba e que na década de 50, entre profissionais e amadores, abrigava 745 pescadores.

Os rios da bacia do Vale do Paraíba apresentavam diversas espécies endêmicas e algumas introduzidas, como é o caso do Dourado (*Salminus maxillosus*), introduzido em 1946 (Caramaschi, 1991).

A ictiofauna da bacia do Paraíba é constituída em sua grande maioria por peixes das ordens Characiformes e Siluriformes (Britski, 1994). Fowler, (1951 e 1954) descreveu 51 espécies oriundas do médio e baixo curso do Paraíba do Sul e 87 descritas em outras bacias. Levantamento ictiológico realizado em 8 localidades da região mais inferior da bacia do Paraíba, do município de Barra do Piraí até a embocadura do rio Paraíba do sul em Atafona, foi realizado entre junho de 1984 e julho de 1985. Neste trecho foram levantadas 80 espécies, 63 gêneros e 27 famílias, sendo que quinze espécies representaram 90,4% das capturas em número e 51,6% em peso (Araújo, 1996). A CESP, em levantamento realizado no reservatório de Paraibuna, constatou a presença de

30 espécies, a maioria de baixo valor comercial (CESP, 1996). Trabalho de mestrado realizado por Lima (1997), descreveu 6 e re-descreveu 33 espécies de peixes do Alto Paraíba do Sul, sendo 13 com suas localidades-tipo na bacia do Paraíba e 19 com uma distribuição mais ampla.

Dados de 1951 mostram que a produção pesqueira do Vale do Paraíba atingira 373.141 kg. Grande parte desta produção, 78%, era proveniente de peixes considerados de segunda, que na sua maioria são adaptados a ambientes lênticos. Já os peixes de maior valor comercial, com exceção do surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*), são de ambientes lóticos, necessitando, com isso, migrar rio acima para efetuarem sua reprodução. (Machado & Abreu, 1952)

Atualmente, a pesca comercial no Vale do Paraíba deixou de representar o papel econômico que possuía há 50 anos. A redução da pesca, representada pela diminuição significativa do número de pescadores ligados à colônia Z-11 de certa forma, pode ser também constatada pela redução e quase desaparecimento de várias espécies de valor comercial.

---

## 1.5. Os Characiformes

..... O surgimento da ordem dos Characiformes (Characoid) aconteceu no mesozóico há 70 - 175 milhões de anos (Gery, 1978). Este grupo parece ter surgido ainda no continente de "Gondwanaland" formado pela África e América do sul. A formação de uma série de lagos com o início da separação dos continentes, criou um ambiente altamente propício para uma explosão evolutiva, principalmente em razão da grande oportunidade ecológica representada por tais nichos.

Os characiformes foram, provavelmente, os primeiros Ostariophysans, isto devido à duas características principais deste grupo: presença do aparelho de Weber, que une a bexiga natatória ao ouvido interno, permitindo sentir sons de alta frequência e presença de alarme químico. Estas duas características são extremamente úteis para peixes que vivem em cardumes, em ambientes de água doce.

Após a separação dos continentes o grupo dos Characiformes, já bem estabelecidos, evoluíram separadamente. A ordem dos Characiformes é composta de 4 a 16 famílias (Greenwood *et al.*, 1966), das quais 4 são endêmicas do continente africano (cerca de 200 espécies). As demais da América Neotropical, as quais atravessaram intensa diversificação, atualmente representam mais que 1.200 espécies. Apesar da extrema importância deste grupo de peixes na ictiofauna da América Neotropical, os modelos de distribuição dos Characiformes na América do sul ainda permanecem desconhecidos (Weitzman, 1982). Weitzman *et al.*, (1988), propuseram que a

presente distribuição da ictiofauna nos cursos de água doce ao longo da costa brasileira, é o resultado de mudanças nos níveis do mar durante os últimos 300.000 anos.

#### 1.5.1. *Brycon* – diversidade e caracterização

O gênero *Brycon* é um Characiforme pertencente à subfamília *Bryconinae* (Família Characidae), e pode ser considerado como um dos maiores grupos de peixes presentes na América Neotropical. Neste gênero são descritos aproximadamente 60 espécies com ampla distribuição geográfica (Howes, 1982). No Brasil, a distribuição do gênero *Brycon* é bastante ampla e representantes deste gênero podem ser encontrados em diversas bacias hidrográficas.

A sistemática do gênero *Brycon* ainda é bastante confusa. Howes (1982) descreveu dez espécies para o grupo *Brycon falcatus* na bacia Amazônica: *B. falcatus*, *B. brevicauda*, *B. bahiensis*, *B. cephalus*, *B. carpophagus*, *B. orthotaenia*, *B. siebenthale*, *B. moorei*, *B. hilaarii* e *B. bicolor*; quatro espécies para o grupo *Brycon acuminatus* nas bacias do sudeste: *B. acuminatus*, *B. ferox*, *B. reinhardti* e *B. devillei* e duas espécies para o grupo *Brycon orbignyanus* para as bacias que compõem os rios Paraná e Paraguai: *B. orbignyanus* e *B. microleptis*.

Géry e Mahnert (1992) agruparam o gênero *Brycon* das bacias brasileiras da seguinte maneira. Na bacia Amazônica central quatro espécies foram reconhecidas e redefinidas, de acordo com o padrão de coloração: *B.*

*melanopterus*, *B. cephalus*, e *B. bicolor*, além de uma espécie não descrita do Rio Madeira, possivelmente *B. brevicauda*. Na Amazônia, o *Brycon* sp. é conhecido como Matrinchã e Jatuarana e a diferenciação de ambos é baseada na coloração. Na Bacia do Prata, os autores redescobriram duas espécies: *B. orbignyanus* e *B. microlepis*. E mais ao sudeste no Rio Paraná e seus afluentes estão presentes *B. hilarii*, *B. opalinus* e *B. orthotaenia*.

Na Bacia do Paraíba, encontramos duas espécies do gênero *Brycon*, sendo uma delas conhecida popularmente como Piabanha (*Brycon insignis*). Este peixe teve grande importância econômica na região, tendo sido classificado como *Megalobrycon piabanha*.

Um grupo de 6 espécies do gênero *Brycon*, popularmente conhecidas como Pirapitinga, Parapitinga ou Parpitinga, é encontrado nas cabeceiras de afluentes de alguns rios brasileiros e possuem similaridades morfológicas significativas. Na bacia do São Francisco é encontrada a espécie *Brycon reinhardt*; na bacia do rio Grande, *Brycon nattereli*; na bacia do rio Paraná duas espécies não descritas e nos afluentes do rio Doce uma também ainda não descrita.

Em afluentes do rio Paraíba, no vale do Paraíba, é encontrada a sexta espécie, conhecida na região como Pirapitinga-do-sul. Esta espécie foi descrita inicialmente por Cuvier (1819), como *Chalceus opalinus*, a partir do holótipo coletado no Rio de Janeiro. Esta espécie foi posteriormente reclassificada por Mueller & Troschel (1844) como uma espécie do gênero *Brycon*. A Pirapitinga-do-sul é citada novamente na literatura científica por Steindachner (1876), que a

identifica erroneamente como *Brycon reinhardt*, espécie descrita por Lutken (1874) no rio das Velhas (bacia do São Francisco). De acordo com Lima (1999)<sup>1</sup>, apesar das semelhanças merísticas dos exemplares oriundos das duas bacias, é aceito que a espécie da bacia do Paraíba seja classificada como *Brycon opalinus*.

### 1.5.2. Importância econômica dos peixes do gênero *Brycon*

Representantes de várias espécies do gênero *Brycon* sempre tiveram importância para a pesca artesanal em diversas regiões no Brasil. Ferreira *et al.* (1996), identificaram as espécies presentes em mercados e indústrias pesqueiras na cidade de Santarém, estado do Pará, baixo Amazonas, nos anos de 1992 e 1993. Dentro das 129 espécies levantadas e identificadas pelos autores, a espécie *Brycon cephalus* (matrinchã e jatuarana) está presente. No mercado Municipal Adolfo Lisboa em Manaus, onde mais de 30% da produção de pescado do estado do Amazonas são comercializados, o matrinchã também está entre as espécies de valor econômico (Bittencourt & Cox-Fernandes, 1990). Algumas características destes peixes, aliadas ao comportamento alimentar onívoro (Goulding, 1980), o que permite a esses animais aceitarem alimentos manufaturados (Reimer, 1982) bem como viverem em ambientes de baixa concentração de oxigênio dissolvido (Braun & Junk, 1982), vêm despertando o interesse para seu cultivo comercial (Mendonça, 1994, Pereira Filho, 1994, Faria, 1994 e Antunes, 1994).

---

<sup>1</sup> Comunicação Pessoal, Flavio Lima – Museu de Zoologia -USP

Não obstante de sua utilização na piscicultura comercial, a Pirapitinga-do-sul tem sido objeto de vários estudos quanto à sua reprodução, fecundidade, comportamento reprodutivo (Narahara, 1994) e quadro hematológico para o acompanhamento de seu estado fisiológico em cativeiro, nos seus vários estágios de vida (Paiva, 1991).

### 1.5.3. Estudos populacionais e filogenéticos

Apesar da grande quantidade de espécies da extensa distribuição geográfica e dos nichos que o gênero *Brycon* apresenta na América Neotropical, poucos têm sido os trabalhos publicados utilizando-se este grupo de peixes em estudos populacionais e filogenéticos.

Margarido *et al.*, (1996) realizaram estudos cromossômicos em sete espécies do gênero *Brycon* provenientes de 7 bacias hidrográficas diferentes e seus resultados mostraram que todas as espécies apresentaram um número diplóide ( $2n=50$ ), com uma estrutura macroestrutural comum entre as espécies analisadas. As sete espécies foram classificadas em dois modos de distribuição da heterocromatina. O Grupo 1 é composto pelas seguintes espécies: *B. orbignyana*, *B. microlepis*, *B. sp.*, e *B. cephalus*, e grupo 2 pelas espécies *B. lundii*, *B. brevicauda* e *B. insignis*.

Almeida-Toledo *et al.*, (1996) avaliaram a composição cromossômica de três espécies: *B. cf. reinhardt* (*B. opalinus*) e *B. insignis*, originárias da bacia do Rio Paraíba, e *B. cf. cephalus*, da bacia do Rio Amazonas. Aqui, também, as três espécies apresentaram um número diplóide ( $2n=50$ ). Os dois trabalhos

mostram uma estrutura cariotípica bastante conservada, que sob o ponto de vista de evolução cromossômica caracteriza espécies de grande tamanho populacional e hábitos migratórios.

Os dois trabalhos mostram a presença de um único par de RONS (região organizadora do nucléolo) localizado no mesmo par de cromossomos, segundo par do grupo SM/ST (submetacêntrico/subtelocêntricos). Esta não é uma característica comum em teleósteos, e evidencia uma relação bastante estreita entre os representantes deste gênero, sugerindo uma possível origem monofilética comum deste grupo.

Estudos genético-bioquímicos da Pirapitinga-do-sul, com base no polimorfismo de transferrinas, mostrou valores de consangüinidade elevados ( $F = 0,421$ ) nos estoques mantidos na Estação de Hidrobiologia e Piscicultura da Hidrelétrica de Paraibuna – CESP (Toledo-Filho, 1994).

Orti (1995) descreveu a seqüência do gene do RNA ribossomal de mitocôndrias de um *Brycon* sp. proveniente do Rio Uruguai, a qual foi comparada com o modo e as taxas de substituição de nucleotídeos entre diversos representantes dos Characiformes.

## II. OBJETIVOS

1. Caracterizar o DNA mitocondrial da Pirapitinga-do-sul (*Brycon opalinus*) baseado na identificação das diferenças em perdas ou ganhos de sítios de restrição por meio da análise de *RFLP*.
  2. Avaliar a variabilidade genética do estoque de reprodutores da Pirapitinga-do-sul mantido em cativeiro na Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna/CESP e comparar sua composição com às populações selvagens.
  3. Estimar a variabilidade genética dentro e entre populações selvagens da Pirapitinga-do-sul, e sua estrutura populacional.
- 
4. Avaliar o DNA mitocondrial como marcador nos repovoamentos com a Pirapitinga-do-sul realizados pela CESP em tributários formadores da bacia do Paraíba do sul.

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3. Origem dos Peixes**

##### **3.1. Locais de coleta**

A Pirapitinga-do-sul (*Brycon opalinus*) (Foto 3.1) é um peixe que vive em ambientes encachoeirados de água corrente. São encontrados em regiões de temperaturas amenas, e costumam habitar as cabeceiras de rios de pequeno e médio porte em áreas de remansos do rio, conhecidas como poções.

A localização das populações de Pirapitinga-do-sul foi inicialmente feita por meio dos registros de coleta e repovoamento, realizados pela equipe de técnicos da Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna. Com base nos registros da Estação, mais as informações provenientes de entrevistas com pescadores locais e populações ribeirinhas, foi feito um primeiro levantamento das áreas, onde as populações selvagens da Pirapitinga-do-sul poderiam estar localizadas.

Numa primeira viagem de campo aos locais inicialmente estabelecidos para verificação da presença de exemplares de Pirapitinga-do-sul, constatou-se a ausência ou diminuição drástica dos estoques selvagens possivelmente devido à sérias modificações ambientais, tais como destruição de matas ciliares, assoreamento dos rios, formação de pastagens e outras práticas agrícolas. Esta situação foi observada, por exemplo, no rio do Salto (município de Paraibuna), e no rio Itagaçaba (município de Silveiras). Rios, estes, em que

parte dos peixes formadores do estoque fundador da piscicultura foram capturados.

As áreas de capturas foram, então, estabelecidas em sete rios contribuintes da bacia do rio Paraíba do Sul (Figura 3.1). Animais mantidos na Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna, como estoque reprodutor, compuseram um oitavo estoque para fins de análise. (Tabela 3.1 e 3.2)

A captura dos indivíduos foi realizada por meio de pesca convencional e rede de espera. As capturas foram feitas com a preocupação de não causar mortalidade excessiva, para que os animais pudessem ser levados vivos para Estação. A captura foi feita com molinete ao final de tarde e pela manhã. No período noturno redes de espera, com malhas de diversos tamanhos, eram deixadas ao longo do rio em pontos previamente escolhidos. Neste tipo de armadilha foi verificado alguma mortalidade devido ao emaranhamento dos animais na rede. Porém, este tipo de procedimento foi algumas vezes necessário devido às dificuldades de captura de uma quantidade significativa de animais para as análises.

### **3.1.1. Estoques Nativos**

#### **Estoque rio Preto**

Os animais deste estoque foram coletados em dois pontos do rio Preto distantes 35 km um do outro. O rio Preto é o principal rio da região serrana do município de Visconde de Mauá (RJ). É um rio de águas frias, apresentando bom estado de conservação em grande parte do seu curso. O rio Preto

deságua no Rio Paraibuna (RJ), que por sua vez deságua no Rio Paraíba do Sul. No ponto 1 foram coletados 14 animais em 1997 e 28 animais em 1998. No ponto 2 foram 10 animais em 1998. (Foto 3.2).

### **Estoque rio Paraibuna**

Os animais deste estoque foram coletados no rio Paraibuna (SP) dentro do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo de Santa Virginia, município de São Luiz do Paraitinga. Assim, por estar dentro de uma área de preservação de Mata Atlântica, o rio Paraibuna e seu ecossistema adjacente apresentam-se em bom estado de preservação. No ponto escolhido foram capturados 40 indivíduos. (Foto 3.3)

### **Estoque rio Buquira**

Os animais deste estoque foram coletados no rio Buquira no município de Monteiro Lobato. Vários trechos do rio estão em bom estado de conservação com matas ciliares recuperadas por produtores rurais da região. A coleta foi realizada em vários trechos do rio em dois anos diferentes. Em 1997 e 1998 foram capturados 10 e 28 exemplares, respectivamente. (Foto 3.4)

### **Estoque rio Itagaçaba**

O rio Itagaçaba, no município de Silveiras, foi usado como ponto de coleta de reprodutores para a Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna. Atualmente, este rio encontra-se em péssimo estado de

preservação, com ausência de matas ciliares em grande parte de seu curso e trechos com assoreamentos excessivos. Situação esta que vem se agravando pela presença de um reflorestamento de eucalipto, sem as devidas medidas conservacionistas para preservação dos recursos hídricos existentes na região. A drástica redução dos estoques foi constatada pela pouca eficiência nas capturas. Em 1997, apenas 1 exemplar foi encontrado. Em 1998, um novo esforço foi feito, e apenas 6 exemplares foram capturados (Foto 3.5).

### **Estoque Rio Martins**

O rio Martins, no município de Natividade da Serra, é um tributário do rio Paraibuna (SP), localizando-se próximo ao reservatório. Neste ponto de coleta foram capturados 10 exemplares em 1997.

### **3.1.2. Estoques Introduzidos**

#### **Estoque Rio do Peixe e Rio Negro**

O rio do peixe e o rio negro eram tributários do rio Paraibuna próximo a antiga nascente rio Paraíba do Sul. Após a formação do reservatório estes dois corpos d'água passaram a desaguar diretamente no reservatório, transformando-se em contribuintes importantes para manutenção do volume do reservatório. Eles foram escolhidos por terem sido pontos de soltura e recaptura de alevinos de Pirapitinga-do-sul para verificação da eficiência dos programas de repovoamento. Os dois rios apresentam trechos bem preservados e trechos em processo de deterioração. No rio do Peixe foram capturados 9 animais em

1997 e 10 animais em 1998. Já no rio Negro, com maiores trechos de matas ciliares e melhor estado de preservação, foram capturados 38 animais em 1998 (Fotos 3.6 e 3.7).

### **3.1.3. Estoque em Cativoiro**

#### **Estoque Piscicultura**

Os animais amostrados na Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna (Foto 3.8) foram considerados como um estoque separado para fins de análise. Aproximadamente 700 animais fazem parte do estoque reprodutor da piscicultura. Estes animais compreendem a geração  $F_3$  ou  $F_4$  do estoque fundador da Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna, o qual foi formado entre 1980-81 com a captura de exemplares do rio Itagaçaba (município de Silveira), do rio Paraibuna (município de São Luiz do Paraitinga) e do rio do Salto (município de Paraibuna). Os animais formadores do estoque atual da piscicultura estão misturados em dois tanques, não sendo possível separá-los de acordo com a origem de coleta.

Oitenta animais (40 machos e 40 fêmeas), com idade superior a 4 anos, foram separados do estoque reprodutor para compor a amostra do estoque da piscicultura.

Tabela 3.1. Período, local e quantidade de animais coletados

Rio	Município	Períodos	
		97	98
Negro	Visconde de Mauá		
	ponto 1	14	28
	ponto 2	-	10
Paraibuna	São Luiz do Paraitinga	40	-
Buquira	Monteiro Lobato	10	28
Itaguaçaba	Silveiras	1	6
Martins	Natividade da Serra	10	-
do Peixe	Natividade da Serra	9	10
Negro	Paraibuna	-	37
Estação	Paraibuna	40	40
Total		124	159

Tabela 3.2- Latitude e Longitude dos locais de coleta da Pirapitinga-do-sul na bacia hidrográfica do Vale do Paraíba

Local de Coleta	Latitude S	Longitude W
1. Rio Preto	22°19'70"	44°32'61"
2. Rio Paraibuna	23°20'08"	45°08'41"
3. Rio Buquira	22°57'59"	45°46'59"
4. Rio Itaguaçaba	22°29'46"	44°45'85"
5. Rio Martins	23°24'89"	45°35'97"
6. Rio do Peixe	23°22'15"	45°19'59"
7. Rio Negro	23°32'67"	45°25'57"
8. Estação	23°29'69"	45°20'11"



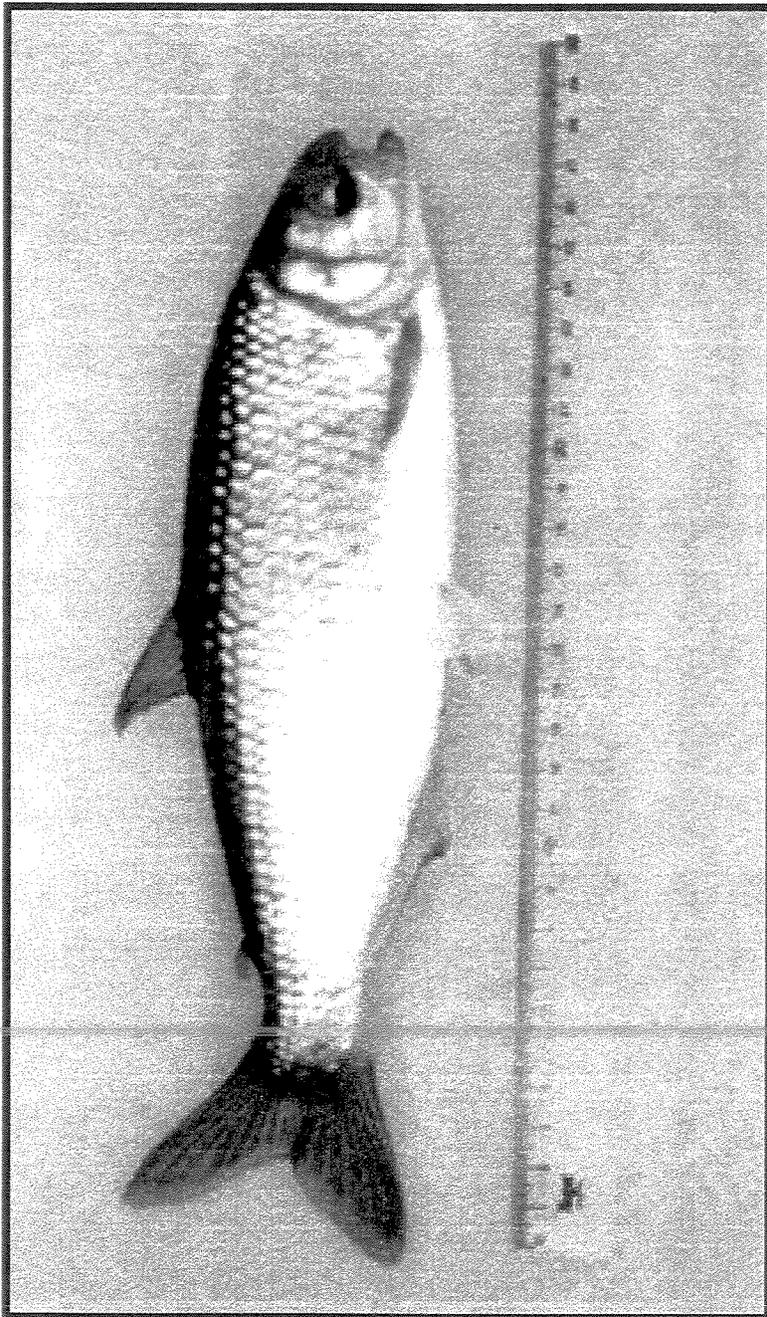
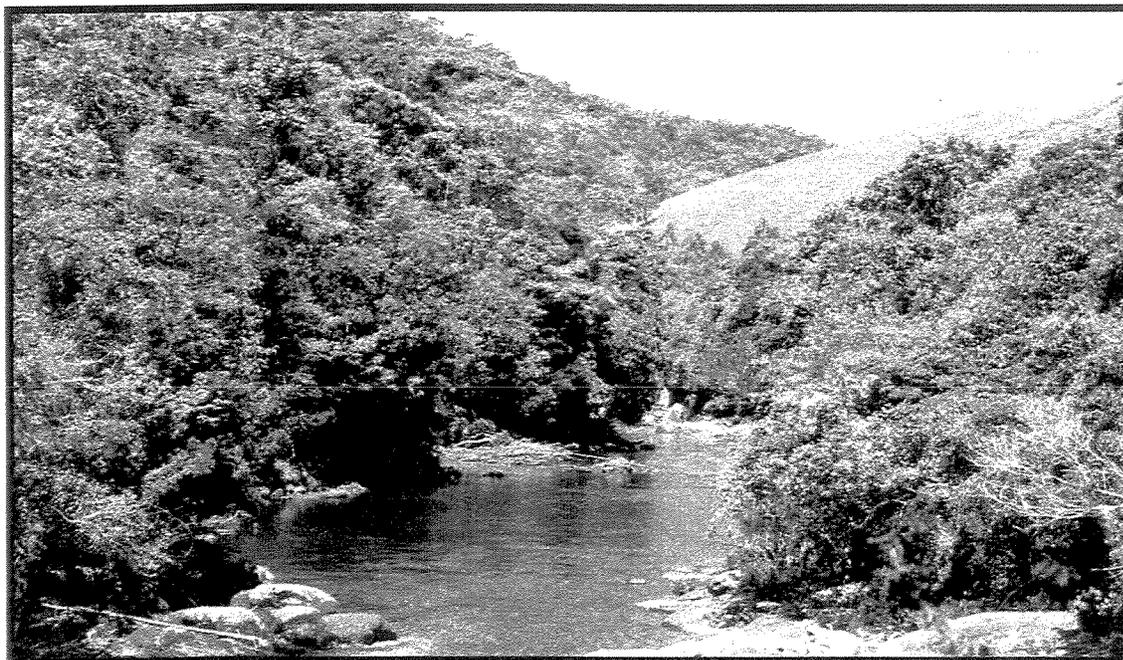


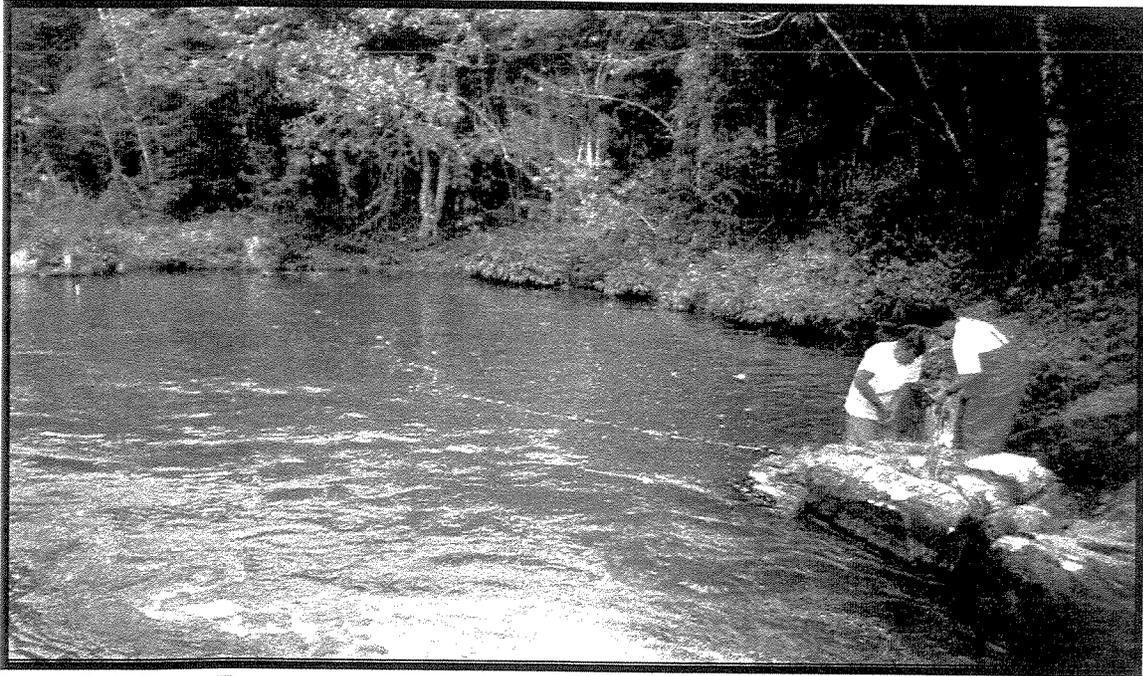
Foto 3.1. Pirapitinga-do-sul (*Brycon opalinus*)



**Foto 3.2. Rio Preto, município de Visconde de Mauá (RJ)**



**Foto 3.3. rio Paraibuna, município de São Luiz do Paraitinga (SP)**



**Foto 3.4. Rio Buquira, município de Monteiro Lobato (SP)**



**Foto 3.5. Rio Itagaçaba, município de Silveiras (SP)**



Foto 3.6. Rio do Peixe, município de Natividade da Serra (SP)



Foto 3.7. Rio Negro, município de Paraibuna (SP)

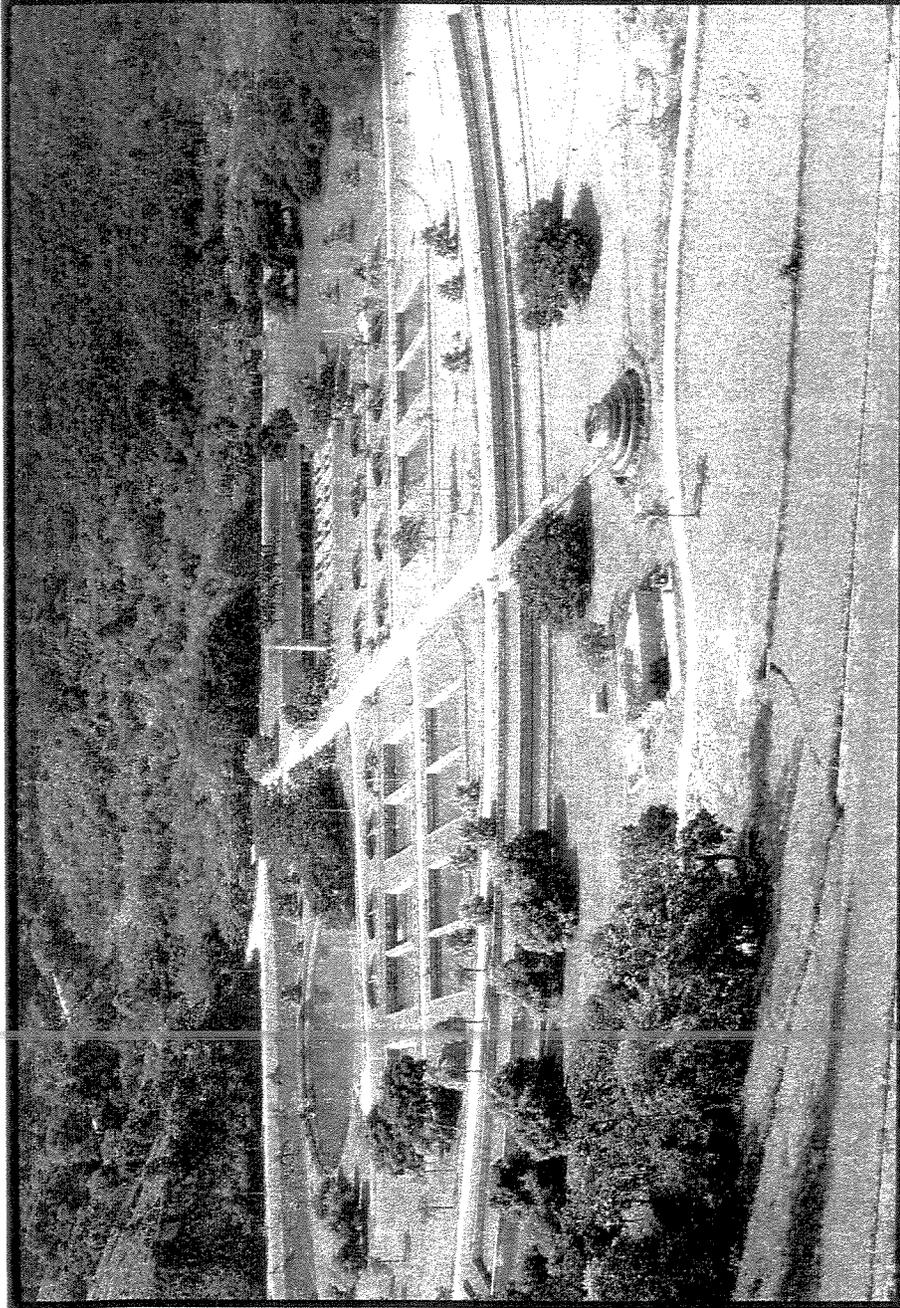


Foto 3.8. Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura da UHE de Paraibuna

## **3.2. Preparação das amostras**

### **3.2.1. Extração do DNA mitocondrial**

Fígado (3 a 4 grs) foi coletado e mantido em tampão estéril - TEK (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,2 M KCl, 0,25 M Sucrose - pH 7,5) até o processamento. No caso de ovos, estes foram mantidos em tubo *Falcon* sem tampão, pois a adição de tampão promove o endurecimento dos ovos pela absorção de água, tornando a homogeneização mais difícil.

O DNAm foi extraído com base no protocolo desenvolvido por Chapman & Powers, (1984) e modificado por Danzmann *et al.*, (1991) pela adição de 0,25 M de sacarose ao tampão inicial (TEK). (Apêndice 4)

Este método permite extrair DNAm parcialmente purificado. A integridade do DNAm é melhor observada em preparações com tecidos (fígado e ovos) coletados logo após a morte do animal e colocados em tampão gelado. Tecidos extraídos desta maneira podem ser mantidos em gelo/geladeira (4°C) por vários dias sem perda significativa da qualidade do DNA.

---

### **3.2.2. Extração do DNA total**

Para obtenção de DNA do estoque reprodutor e de animais selvagens, procurou-se desenvolver outro método de extração de DNA sem a necessidade do sacrifício dos exemplares. Assim, optou-se por seguir um protocolo de extração de DNA total (nuclear e mitocondrial) para que, por meio de sondas marcadas, os fragmentos de DNAm pudessem ser evidenciados.

Inicialmente foi testado o protocolo de extração de DNA total com amostras de sangue extraídas de veia/artéria caudal (Billington & Hebert, 1990). Porém, a qualidade de visualização dos fragmentos de DNAMt não foi boa, muitas vezes sendo difícil observar fragmentos de DNAMt de baixo peso molecular.

Assim, procurou-se obter uma preparação de DNA mais enriquecido com DNA mitocondrial. Uma biopsia de músculo esquelético da região dorsal, entre a nadadeira dorsal e adiposa (Hilsdorf *et al.*, 1999), foi realizada em uma amostra de animais. Nenhuma mortalidade foi constatada entre os indivíduos biopsiados, permitindo, desta forma, a obtenção de quantidades suficientes de tecido rico em mitocôndrias, e conseqüentemente de DNA mitocondrial.

A extração de DNA total foi feita de acordo com protocolo descrito por Taggart *et al.*, (1992), modificado pelo uso de tampão STE (0,1 M NaCl, 0,05M Tris-HCl e 0,01M EDTA, pH 8,0) (Apêndice 4). Neste tampão usa-se menores quantidades de EDTA, visto que este pode reagir com MgCl<sub>2</sub> e reduzir a eficiência de amplificação pelo PCR, para o caso de uso futuro das amostras.

### **3.3. Obtenção de sondas do DNAMt da Pirapitinga-do-sul**

#### **3.3.1. Processo de purificação do DNAMt**

O processo de clonagem do DNAMt da espécie em estudo foi feito em razão da ausência de trabalhos publicados com espécies do gênero *Brycon* ou gêneros correlatos, em que o DNAMt tivesse sido clonado.

O DNAMt da Pirapitinga-do-sul foi extraído de ovos maduros de fêmeas (Chapman & Powers, 1984) para obtenção de DNAMt com maior pureza. As amostras de DNAMt foram submetidas à testes para escolha da enzima a ser utilizada para clonagem. Das 19 enzimas da região de clonagem do vetor *pBluescript<sup>®</sup> Amp SK(+)* (Stratagene) (Figura 3.2) a enzima de restrição *Bam*HI foi escolhida por clivar o DNAMt da espécie em três fragmentos de 7.710, 4.930 e 2.125 pares de bases.

Uma amostra de DNAMt foi digerida com a enzima *Bam*HI e os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 1%. Os fragmentos de DNAMt foram, então, retirados do gel com o auxílio de um bisturi. A extração dos fragmentos de DNAMt do gel de agarose foi feita com o auxílio do *Kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen/cat n° 28706).

Este sistema consiste na passagem da amostra de DNA eluída em tampão, através de uma coluna que contém uma membrana de sílica gel com propriedades de ligação seletiva. O ácido nucléico é adsorvido pela membrana na presença de alta concentração de sais caotrópicos, enquanto que os contaminantes a atravessam livremente durante a microcentrifugação. Após isolamento dos fragmentos purificados de DNAMt, procedeu-se a quantificação do DNA purificado para seu uso no processo de clonagem.

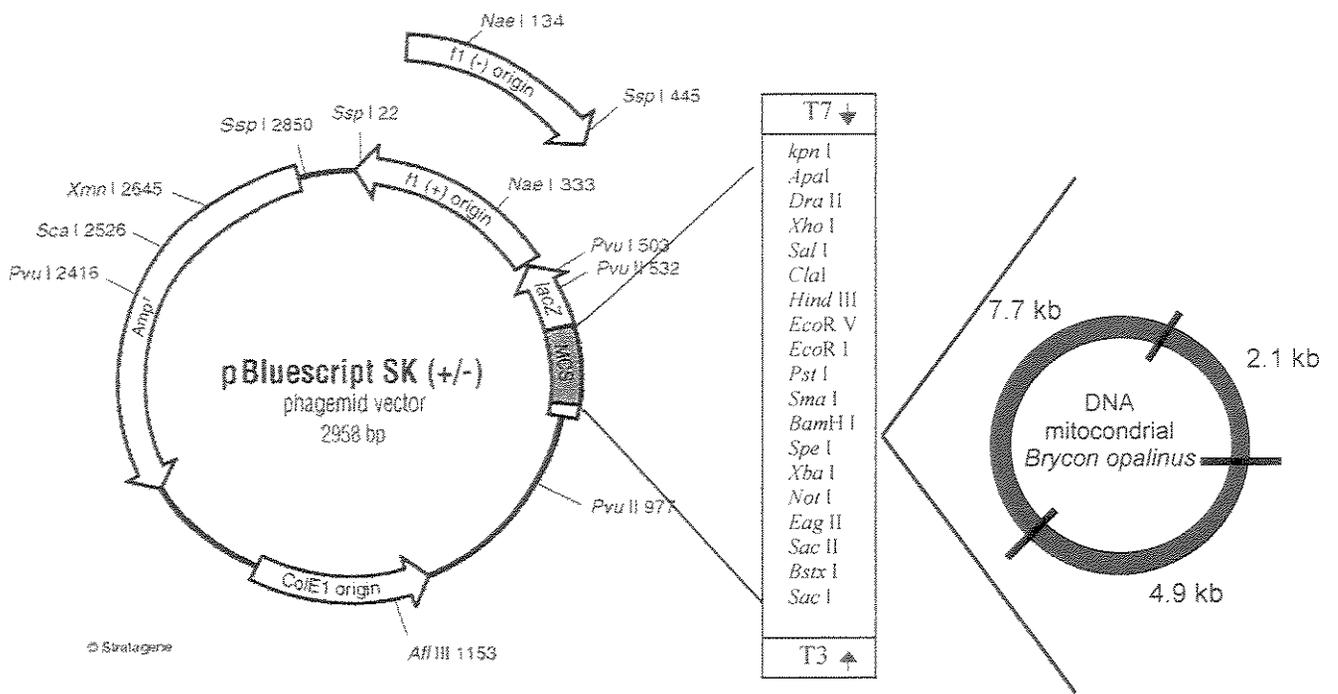


Figura 3.2. Fragmentos de DNAm<sup>t</sup> para clonagem no sítio de *Bam*H I da região de clonagem do Plasmídeo *pBluescript*<sup>®</sup> *Amp SK(+)* (*Stratagene*).

### 3.3.2. Clonagem e transformação

Os fragmentos purificados foram ligados ao plasmídeo *pBluescript<sup>®</sup> Amp SK(+)* (*Stratagene*) por meio de uma reação contendo 1  $\mu$ l de vetor 10 ng/ $\mu$ l (2.961 Kb), 3  $\mu$ l de inserto, 1  $\mu$ l de 10mM rATP pH 7,5, 2  $\mu$ l de tampão de ligação, 1 $\mu$ l de T4 DNA ligase (*Stratagene*) e 2  $\mu$ l de água deionizada. A reação foi incubada a temperatura ambiente por no mínimo 1 hora e, então, aquecida a 65°C por 10 min a fim de promover a ligação do fragmento de DNAmT ao vetor plasmidial.

Os plasmídeos, *pBluescript<sup>®</sup> Amp SK(+)* contendo os insertos de DNAmT foram amplificados pela transformação em bactéria competente *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ). Para isto, de 5 a 10  $\mu$ l da reação de ligação foram adicionados à uma alíquota de 200  $\mu$ l de bactéria competente e, após leve homogeneização, a mistura foi incubada em gelo por 30 min. Em seguida, as bactérias foram submetidas à um choque térmico, sendo incubadas a 42°C por 1 min e rapidamente deixadas em gelo por mais 1 min. Após este tempo, 800  $\mu$ l de meio de cultura LB (10 g Triptona/ 5 g Extrato de levedura/10 g de NaCl/ água deionizada para 1 litro) foram acrescentados, e a cultura incubada a 37°C, por 1 hora, sob agitação. Finalmente, após centrifugação a 8000 rpm por 20 seg, a temperatura ambiente, o precipitado de bactérias foi resuspenso em 200  $\mu$ l de meio e espalhado em placa de Petri 92x17 mm (*Nunc*), contendo LB sólido (1,5% de bacto-agar) com 50  $\mu$ g/ml de antibiótico ampicilina (*Sigma*) para seleção das colônias transformantes. Ainda, para a identificação dos clones

contendo o inserto, foi adicionada à placa 40 µl de *X-gal* (20 mg/ml) e 4 µl de IPTG (200 µg/ml). Após a inoculação, a placa de Petri foi incubada em estufa a 37°C por 16 horas.

Para detectar as colônias positivas, ou seja, aquelas contendo o fragmento de DNAm<sub>t</sub> ligado ao vetor plasmidial, cada uma das colônias brancas formadas na placa foi inoculada em tubo estéril 17x100 mm (*USA Scientific Plastics*) contendo 2 ml de LB com ampicilina (50 µg/ml). Os tubos foram, então, incubados, sob agitação, a 37°C por 16 horas. Após o crescimento bacteriano, 1,5 ml da cultura foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min e o DNA extraído utilizando-se o *QIAprep spin Miniprep Kit* (*Qiagen/ cat. n.º. 27106*).

### **3.3.3. Identificação dos clones positivos**

Os plasmídeos purificados foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Bam*HI, de forma que, após eletroforese, os clones positivos pudessem ser identificados. Em seguida, 5 µl do DNA extraído pela mini-preparação, *pBluescript<sup>®</sup> Amp SK(+)* contendo os insertos de DNAm<sub>t</sub>, foram digeridos com 10U de *Bam*HI (*Gibco BRL-Life Technologies*) mais *1X react buffer 2* (*Gibco BRL-Life Technologies*) para um volume final da reação de 20 µl. Após incubação, a 37°C por 2 horas, 3 µl de tampão de amostra 6X foi adicionado à reação de digestão. Os produtos da digestão foram aplicados em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo e submerso em tampão TAE 1X. A eletroforese foi realizada por aproximadamente 45 min a 100

volts e o gel visualizado sobre luz ultra violeta para que a migração dos fragmentos pudessem ser comparada a do marcador  $\lambda$  *Hind* III (*Gibco-BRL*).

#### **3.3.4. Maxi-preparação do DNA plasmidial**

Dos clones positivos, provenientes da mini-preparação, 500  $\mu$ l de cultura foram inoculadas em 500 ml de meio LB contendo ampicilina (50  $\mu$ g/ml), e mantidos sob agitação a 37°C por 16 horas. Em seguida, cerca de 2 alíquotas de 1 ml cada, contendo 800  $\mu$ l da cultura e 200  $\mu$ l de glicerol, foram armazenadas a -80°C, e o restante centrifugado a 4000 rpm, a 4°C por 15 min. Com o precipitado bacteriano, resultante da centrifugação, foi realizado a lise alcalina das células, num processo de preparação de DNA plasmidial semelhante ao descrito anteriormente, porém, em maior escala, denominado maxi-preparação de DNA plasmidial (*Maxi-prep*). A extração do DNA e sua purificação foi realizada com a utilização do *Plasmid Maxi Kit* (*Qiagen/ cat. n° 12165*).

---

#### **3.3.5. Análise das enzimas informativas**

Um total de 24 endonucleases (Tabela 3.3) foram usadas para realizar um levantamento inicial da variabilidade do DNAm. Oitenta animais proveniente dos diversos estoques amostrados foram testados para cada uma das 27 enzimas.

Cada peixe de todos os estoques amostrados foi submetido a digestão do DNA total com cada uma destas enzimas. As digestões foram feitas com a preparação da reação básica de 2µl tampão específico 10x, 2-5 unidades de enzima de restrição, 0.2µg de RNase a um volume final por digestão de 20 µl. As condições de incubação foram feitas de acordo com as especificações do fabricante.

Os fragmentos resultantes da digestão foram mantidos a 4°C para posterior uso ou separados imediatamente por eletroforese a 20 V por 16 h, em gel de agarose (1%) submerso em tampão TAE 1X (0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA). O padrão de migração dos fragmentos foi comparado ao padrão do marcador  $\lambda$  *Hind* III (*Gibco-BRL*), sendo que as diferenças em mobilidade entre eles foram medidas, e o tamanho do DNAm estimado pelo programa DNAgel (Kieser,1984).

As amostras de DNA de cada estoque foram submetidas a eletroforese, como descrito anteriormente, e transferidas para membranas apropriadas por *Southern Blotting* (Southern, 1975). Após a eletroforese o DNA foi denaturado (1,5M NaCl e 0,5M de NaOH) e neutralizado (1M tris-HCl e 1,5M NaCl). Os fragmentos de DNA, contidos no gel, foram transferidos para uma membrana de *nylon* (*Biodyne*) com uma solução de 20X SSC (3 M NaCl e 0,3 M de Citrato de Sódio). Após a transferência, o material foi fixado à membrana através de irradiação ultra-ultravioleta (*UV Stratalinker 1800 - Stratagene*).

A membrana foi pré-hibridizada com uma solução contendo 5X solução de *Denhardt*, 6X SSC, 50% de formamida, 0,5% de SDS e 10 mg/ml de DNA de esperma de salmão denaturado, por no mínimo 2 horas a 42°C. O DNA de esperma de salmão evita ligações inespecíficas da sonda à membrana.

A hibridização ocorreu sob as mesmas condições da pré-hibridização, porém, com ausência da solução de *Denhardt*, por no mínimo 18 horas. Como sonda foram utilizados os fragmentos de DNAm<sub>t</sub> da Pirapitinga-do-sul clonados como descrito anteriormente, e marcados radioativamente com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP por *random primer extension* (*Ready-To-Go DNA labeling Beads (-dCTP) - Pharmacia*) para hibridização com o DNAm<sub>t</sub> fixado na membrana.

Para retirada de ligações não específicas, a membrana foi lavada 2 vezes por 10 min, em 2X SSC; 0,1% SDS a temperatura ambiente, e 2 vezes por 10 min, em 0.1X SSC; 0,1% SDS a 68°C. As membranas foram, então, expostas em filmes de raio-X (*BIOMAX™ MR*) e deixadas a - 70°C por no mínimo 12 horas.

Tabela 3.3 . Lista de enzimas utilizadas, seqüência de reconhecimento e valores de r (Nei, 1987).

<b>Enzimas</b>	<b>Seqüência de <sup>1</sup> reconhecimento</b>	<b>r</b>
<i>Apa I</i>	GGGCC/C	6
<i>Ava II</i>	G/G(W)CC	4.6
<i>BamH I</i>	G/GATCC	6
<i>Bcl I</i>	T/GATCT	6
<i>Bgl II</i>	A/GATCT	6
<i>BssH II</i>	G/CGCGC	6
<i>Cla I</i>	AT/CGA	5
<i>Dra I</i>	TTT/AAA	6
<i>EcoR I</i>	G/AATTC	6
<i>Hinc II</i>	GT(Y)/(R)AC	5.3
<i>Hind III</i>	A/AGCTT	6
<i>Hpa I</i>	GTT/AAC	6
<i>Kpn I</i>	GGTAC/C	6
<i>Mlu I</i>	A/CGCGT	6
<i>Nco I</i>	C/CATGG	6
<i>Nhe I</i>	G/CTAGC	6
<i>Pst I</i>	CTGCA/G	6
<i>Pvu II</i>	CGAT/CG	6
<i>Sst I</i>	GAGCT/C	6
<i>Sal I</i>	G/TCGAC	6
<i>Sma I</i>	CCC/GGG	6
<i>Spe I</i>	A/CTAGT	6
<i>Xba I</i>	T/CTAGA	6
<i>Xho I</i>	C/TCGAG	6
<b>24 enzimas</b>		<b>6</b>

<sup>1</sup> A=Adenina G= Guanina C= Citosina T=timina  
W= A ou T Y= C ou T R= A ou G

### **3.4. Metodologia de análise**

#### **3.4.1. RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism***

RFLP que pode ser traduzido por “polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição”. Esta técnica foi inicialmente usada para detecção de mutações em DNA de vírus (Grodzicker *et al.*, 1974) e posteriormente foi empregada para análise genômica (Wyman & White, 1980).

A técnica do RFLP é baseada na detecção de fragmentos gerados por digestão com enzimas de restrição. O polimorfismo é observado pelas diferenças nas seqüências do DNA de dois indivíduos, que possibilitem o aparecimento ou desaparecimento de um sítio de restrição específico. Portanto, em indivíduos em que não há diferença de nucleotídeos na região do sítio de restrição os fragmentos migram da mesma forma em gel. Em contraste, diferenças de nucleotídeos produzirão diferentes padrões de restrição.

#### **3.4.2. Análise Estatística**

Os dados apresentados no presente estudo foram analisados a partir da combinação dos haplótipos mitocondriais obtidos a partir dos sítios polimórficos de restrição observados para cada enzima marcadora.

As estimativas de distâncias genéticas entre todos os pares de haplótipos foram calculadas com a utilização de uma matriz de presença/ausência para os 16 sítios de restrição que apresentaram polimorfismo, de acordo com o método desenvolvido por Nei & Tajima (1981) e Nei & Muller, (1990).

A diversidade haplotípica ( $h$ ) ou diversidade do *nucleon* é a medida bruta de variabilidade, isto é, a probabilidade de que dois haplótipos sejam diferentes em uma dada população (Nei, 1987). Pode-se dizer que o índice de diversidade haplotípica é o correspondente a heterozigose em uma população diplóide.

A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) dentro da população, que expressa o número médio de diferenças nucleotídicas entre os haplótipos, isto é, a probabilidade de que dois nucleotídeos homólogos escolhidos ao acaso sejam diferentes, foi calculado de acordo com Nei & Muller, (1990). Esta equação foi desenvolvida com base nos valores de distâncias genéticas entre pares de haplótipos, calculado a partir de Nei & Muller, (1990).

A diversidade entre as populações, que é o número mínimo de substituições entre duas populações, foi calculada pela estimativa de Divergência Nucleotídica Interpopulacional ( $\sigma$ ) (Nei, 1987). Nesta equação deve-se subtrair o efeito do polimorfismo intrapopulacional, pois na presença de sequências polimórficas o tempo de divergência entre os alelos é geralmente maior do que o tempo de separação das populações.

As estimativas de distância genética, diversidade nucleotídica e haplotípica intrapopulacional e divergência nucleotídica interpopulacional descritas acima foram calculadas com o uso do programa REAP - *The Restriction Enzyme analysis Package* (Mc Elroy *et al.*, 1992).

A análise da estrutura genética das populações foi realizada pela Análise da Variância Molecular (AMOVA – *Analysis of MOlecular VAriance*). Esta

estimativa leva em consideração a frequência de distribuição dos haplótipos, e o número de diferenças de sítios de restrição entre eles. Os valores de divergências são incorporados à uma análise de variância para estimar o grau de subdivisão genética intraespecífica (Excoffier *et al.*, 1992). Desta forma são produzidos estimativas dos componentes de variância e valores análogos ao  $F_{st}$  (Wright, 1951), modificados para genomas haplóides (Weir & Cockerham, 1984).

A *AMOVA* foi processada com o programa Arlequin, versão 1.0 (Schneider *et al.*, 1997). As fórmulas para os cálculos estão apresentadas no Apêndice 5.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação e seleção das enzimas de restrição

Das 24 enzimas de restrição utilizadas neste estudo, 6 foram marcadoras e produziram padrões variáveis – *Apa* I, *Ava* II, *EcoR* I, *Hinc* II, *Hpa* I e *Nhe* I – para o genoma mitocondrial do *Brycon opalinus* (Figuras 4.1 a 4.3). Desta forma, somente estas enzimas foram selecionadas para caracterizar a variabilidade do DNAmT nos peixes amostrados. Os padrões polimórficos para cada enzima foram designados em ordem alfabética conforme a frequência com que estes apareciam nas populações.

Com base nas mobilidades dos fragmentos das 24 endonucleases utilizadas (Tabela 4.1), o tamanho total estimado para o DNAmT do *B. opalinus* foi de cerca de 16.300 ( $\pm$  500) pb.

### 4.2. Composição de haplótipos do DNAmT da Pirapitinga-do-sul

Dos 283 animais analisados foram identificados 27 haplótipos (Tabela 4.2). Estes haplótipos foram gerados pela combinação dos padrões produzidos pelas seis endonucleases informativas, e são caracterizados pela perda ou ganho de um sítio de restrição. Não houve evidências de variação atribuída a diferença de tamanho da molécula.

A análise dos tamanhos dos fragmentos de restrição gerados pelas enzimas polimórficas, possibilitou a elaboração de um diagrama de interconversão, sobre o qual pode-se inferir os possíveis passos mutacionais

que ocorreram no DNAmT da Pirapitinga-do-sul (Figuras 4.4 e 4.5) no período recente de sua evolução. Considerou-se para isso, que perdas de sítios de restrição são mais comuns que ganhos (Templeton, 1983).

A enzima *Apa* I gerou dois padrões de fragmentos. O padrão B provavelmente deu origem ao padrão A pela perda de  $A_2$  (Figura 4.4 - a). A enzima *Ava* II também gerou dois padrões, sendo que o padrão B originou o padrão A possivelmente pela perda de  $B_2$  (Figura 4.4 - b).

A enzima *EcoR* I gerou três padrões. O padrão A pode ter originado o padrão B pela perda de  $C_5$  e ter sido originado a partir de C pela perda de  $C_3$  (figura 4.4 – c). O padrão A de *Hinc* II provavelmente gerou o padrão B pela perda de  $D_3$  (Figura 4.5 - d). A enzima *Hpa* I originou quatro padrões de fragmentos. O padrão A possivelmente gerou os padrões C e D pela perda de  $E_3$  e  $E_5$ , respectivamente. O padrão de fragmentos de B mostra que ele pode ter sido originado de D pela perda de  $E_3$  e o ganho de  $E_2$  ou mesmo de C pelo ganho de  $E_2$  e a perda de  $E_5$  (Figura 4.5 – e). Por último, a enzima *Nhe* I com três padrões de fragmentos. O padrão A originou B pela perda de  $F_4$  e B originou C pela perda de  $F_5$ . Desta forma, o padrão C foi gerado a partir de A pela perda de  $F_4$  e  $F_5$  (Figura 4.5 – f).

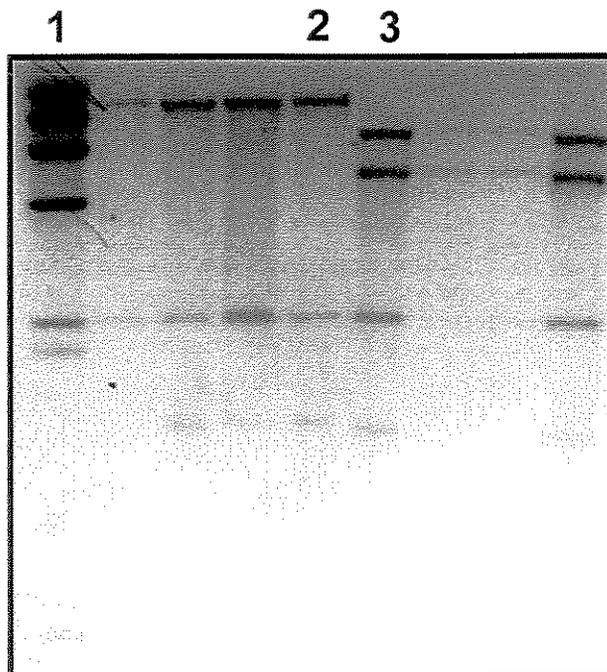
Algumas amostras evidenciaram um padrão de digestão que apresentou o fragmento de 1180 pb do padrão A, junto com o fragmento de 1260 pb do padrão B, quando digeridas com a enzima *Nhe* I. A presença dos padrões A e B no mesmo indivíduo sugeriu a ocorrência do fenômeno de heteroplasmia de

sítio de restrição para a endonuclease *Nhe* I, isto é, a presença de dois tipos diferentes de DNA mitocondrial no mesmo indivíduo, na espécie *B. opalinus*.

Tabela 4.1. Tamanhos dos fragmentos (kb) para as enzimas de restrição.

Enzimas e Padrões													
<i>Apa</i> I	A	12,47	2,34	1,53									
	B	7,4	5,06	2,34	1,53								
<i>Ava</i> II	A	3,95	3,55	1,85	1,77	1,34	1,22	1,12	0,54	0,36	0,31	0,24	
	B	3,55	3,05	1,85	1,77	1,34	1,22	1,12	0,91	0,54	0,36	0,31	0,24
<i>Bam</i> H I	A	7,71	4,93	2,12									
<i>Bcl</i> I	A	16.300											
<i>Bgl</i> II	A	7,79	6,25	2,36									
<i>Bss</i> H II	A	ausência de sítio de restrição											
<i>Cla</i> I	A	16.300											
<i>Dra</i> I	A	4,02	3,18	2,73	2,59	1,82	1,11	0,88					
<i>Eco</i> R I	A	8,55	4,21	2,62	0,85								
	B	8,55	4,21	3,47									
	C	8,55	2,62	2,10	2,10	0,51							
<i>Hinc</i> II	A	4,52	2,57	2,45	2,32	2,19	1,85	0,33					
	B	4,52	2,89	2,45	2,32	2,19	1,85						
<i>Hind</i> III		9,14	3,07	2,69	0,85	0,74							
<i>Hpa</i> I	A	9,29	2,73	2,49	1,41	0,42							
	B	7,02	4,77	3,15	1,41								
	C	11,79	2,73	1,41	0,42								
	D	9,29	3,15	2,49	1,41								
<i>Kpn</i> I	A	ausência de sítio de restrição											
<i>Mlu</i> I	A	13,23	3,15										
<i>Nco</i> I	A	16.300											
<i>Nhe</i> I	A	9,17	4,27	1,18	0,56	0,52	0,35	0,29	0,08				
	B	9,17	4,27	1,26	0,56	0,52	0,35	0,29					
	C	9,17	4,27	1,26	1,18	0,56	0,52	0,35	0,29	0,08			
<i>Pst</i> I	A	7,08	5,59	1,08	0,99	0,92	0,68						
<i>Pvu</i> II	A	11,83	3,26	1,28									
<i>Sst</i> I	A	11,07	5,34										
<i>Sal</i> I	A	ausência de sítio de restrição											
<i>Sma</i> I	A	16.300											
<i>Spe</i> I	A	6,59	5,32	2,44	1,64	0,42							
<i>Xba</i> I	A	10,03	4,16	2,12									
<i>Xho</i> I	A	ausência de sítio de restrição											

*Apa* I



*Ava* II

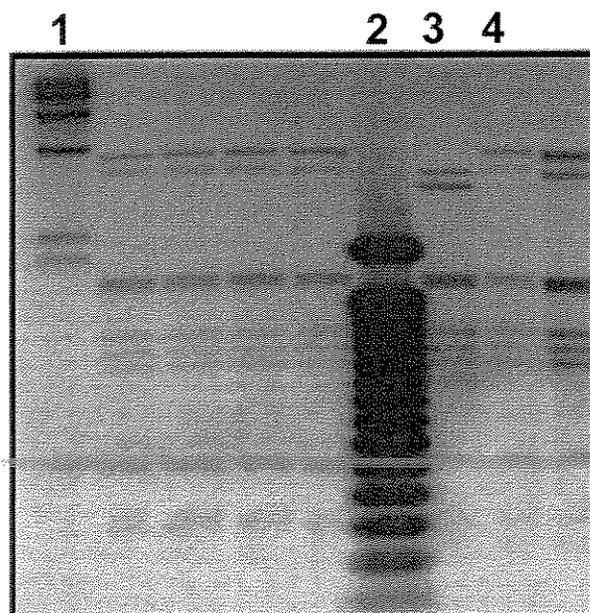
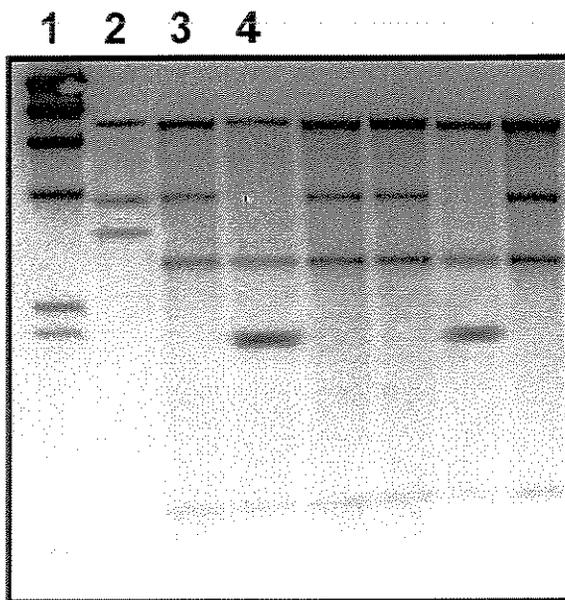


Figura 4.1 – Autorradiograma com os padrões de fragmentos obtidos por transferência (*Southern blot*) do DNAm<sub>t</sub> da Pirapitinga-do-sul para as enzimas de restrição *Apa* I e *Ava* II. No painel superior, a coluna 1 indica o marcador  $\lambda$  *Hind* III e as colunas 2 e 3 os padrões A e B para enzima de restrição *Apa* I. No painel inferior, a coluna 1 indica o marcador  $\lambda$  *Hind* III, a coluna 2 o marcador *100 bpDNA ladder* e as colunas 3 e 4 representam os padrões B e A para a enzima *Ava* II.

*EcoR* I



*Hinc* II

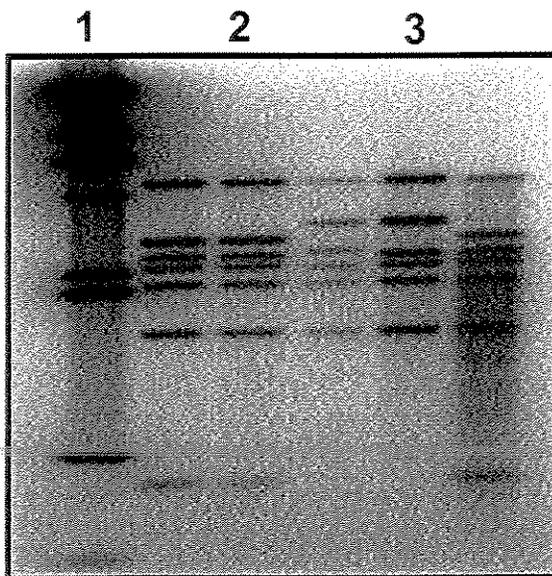
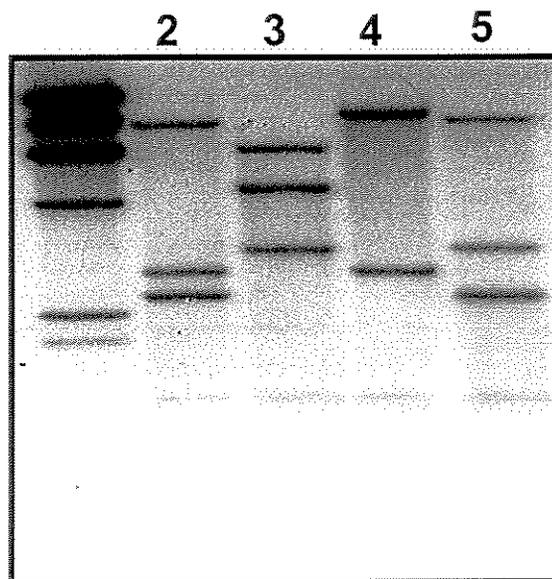


Figura 4.2 – Autorradiograma com os padrões de fragmentos obtidos por transferência (*Southern blot*) do DNAm<sub>t</sub> da Pirapitinga-do-sul para as enzimas de restrição *EcoR* I e *Hinc* II. No painel superior, a coluna 1 indica o marcador  $\lambda$  *Hind* III e as colunas 2, 3 e 4 os padrões B, A e C. No painel inferior, a coluna 1 indica o marcador  $\lambda$  *Hind* III, e as colunas 2 e 3 os padrões A e B.

*Hpa* I



*Nhe* I

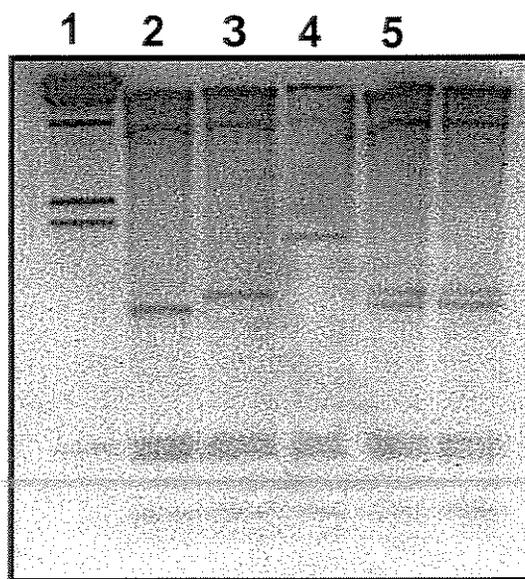
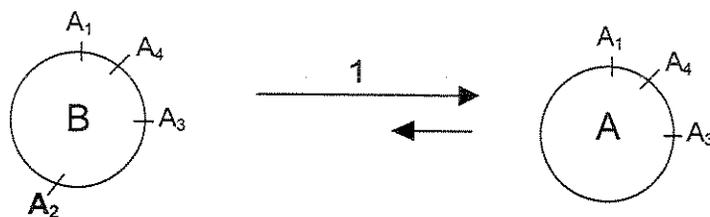


Figura 4.3 – Autorradiograma com os padrões de fragmentos obtidos por transferência (*Southern blot*) do DNAMt da Pirapitinga-do-sul para as enzimas de restrição *Hpa* I e *Nhe* I. No painel superior, a coluna 1 indica o marcador  $\lambda$  *Hind* III e as colunas 2, 3, 4, 5 os padrões A, B, C e D. O painel inferior, a coluna 1 indica o marcador  $\lambda$  *Hind* III, as colunas 2, 3, 4 representam os padrões A, B, C, e a coluna 5 o padrão heteroplásmico.

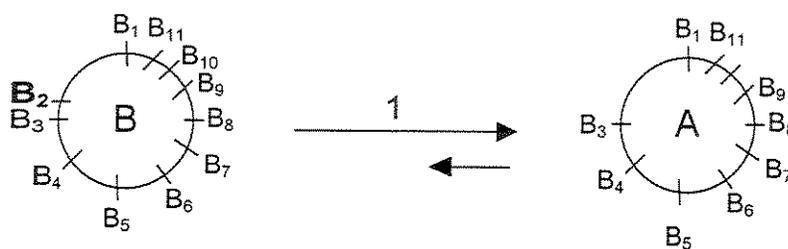
Tabela 4.2. Haplótipos do DNA mitocondrial identificados na Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura da CESP/Paraibuna e dos estoques selvagens da bacia do Paraíba do Sul.

Haplótipos	<i>Apa</i> I	<i>Ava</i> II	<i>Eco</i> RI	<i>Hinc</i> II	<i>Hpa</i> I	<i>Mhe</i> I
1	A	A	A	A	A	A
2	A	A	A	B	D	B
3	A	A	A	A	A	B
4	A	A	A	A	B	B
5	B	A	A	A	A	B
6	B	A	A	B	A	A
7	A	A	A	A	D	B
8	A	A	A	B	A	B
9	A	B	A	B	D	B
10	A	A	A	B	B	B
11	A	B	A	A	A	A
12	A	B	A	A	D	B
13	A	A	A	B	A	A
14	A	A	A	A	B	A
15	A	A	A	B	B	B
16	A	A	C	A	A	A
17	A	B	A	A	A	C
18	A	B	A	B	A	B
19	A	A	A	B	A	C
20	A	A	A	A	C	B
21	A	A	A	A	B	C
22	A	A	A	A	C	A
23	A	A	B	A	A	A
24	A	B	B	A	A	A
25	A	A	B	B	B	A
26	A	B	A	A	A	A
27	A	A	A	B	D	A

a- *Apa* I



b- *Ava* II



c- *Eco*R I

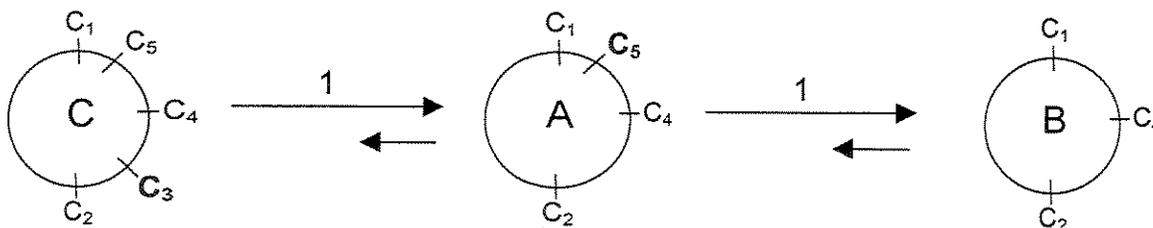
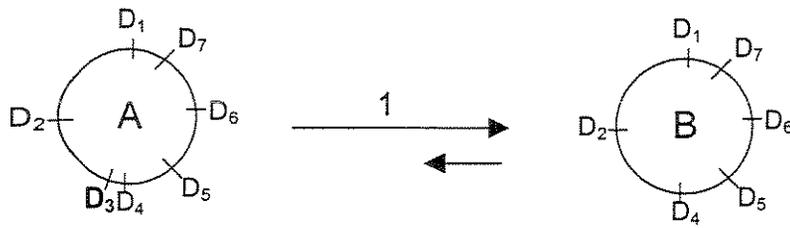
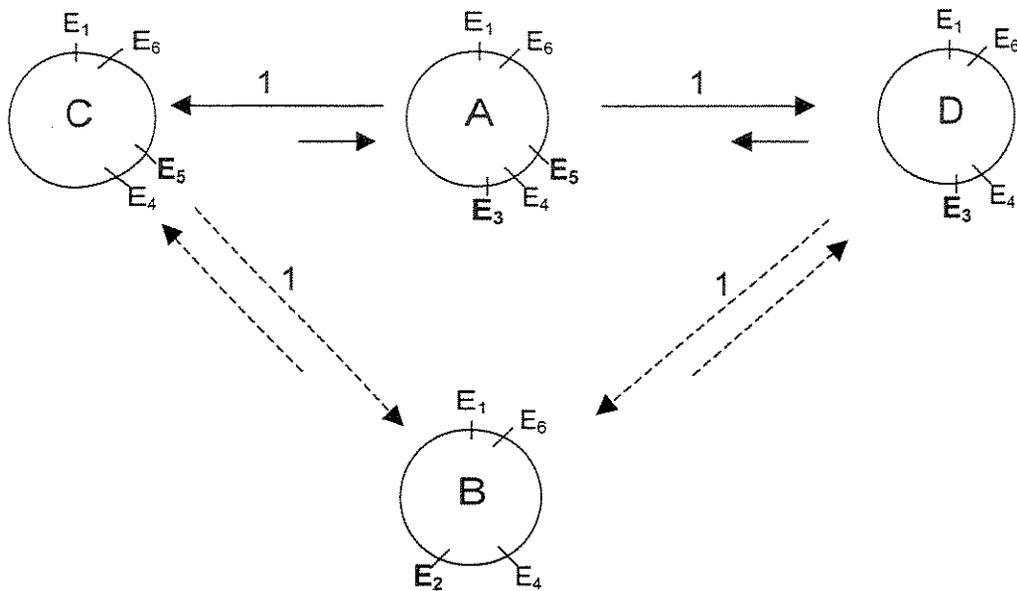


Figura 4.4. Diagrama de interconversão entre os padrões de restrição obtidos para o DNA mitocondrial da Pirapitinga-do-sul com as enzimas *Apa* I, *Ava* II e *Eco*R I. As setas indicam a provável direção de evolução. O número de perdas ou ganhos de sítios de restrição está indicado.

c- *Hinc* II



d- *Hpa* I



e- *Nhe* I

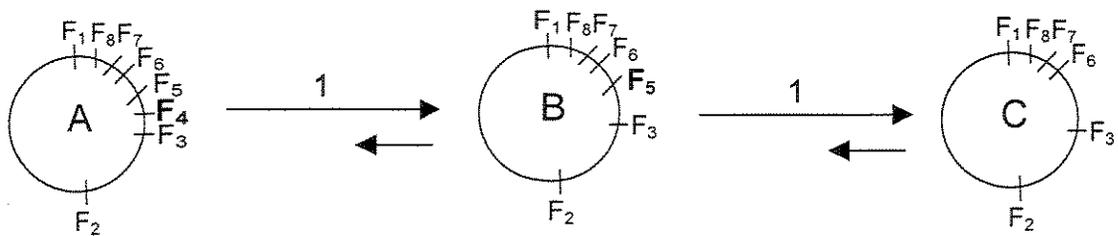


Figura 4.5 – Diagrama de interconversão entre os padrões de restrição obtidos para o DNA mitocondrial da Pirapitinga-do-sul com as enzimas *Hinc* II I, *Hpa* I e *Nhe* I. As setas indicam a provável direção de evolução. O número de perdas ou ganhos de sítios de restrição está indicado.

#### **4.3. Frequência e diversidade haplotípica e nucleotídica na Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna**

A Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna, onde a espécie é reproduzida, foi considerada um estoque a parte na análise da estrutura populacional da espécie na natureza, visto que este tem sido mantido isolado, sem a introdução de novos estoques fundadores.

Na Estação foram observados 11 haplótipos (1, 3, 4, 5, 11, 15, 22, 23, 24, 25, 26). O haplótipo 22 foi o mais freqüente, ocorrendo em 28,75% do total de animais amostrados. Já o haplótipo 1, observado como o mais freqüente em ambiente natural, como veremos a seguir, apresentou uma freqüência de 16,25% na Estação.

Os haplótipos 24 e 25 não foram detectados nos indivíduos coletados na natureza, o que sugere a preservação de haplótipos possivelmente já extintos nos ambientes naturais. Outra característica importante observada na distribuição dos haplótipos na Estação foi a presença de heteroplasmia de sítio de restrição em 2.5 % dos animais avaliados.

A diversidade haplotípica ( $h$ ) observada no estoque reprodutor foi de 0.753, isto é, há 75.34% de chance de que dois haplótipos sejam diferentes entre os indivíduos que compõe o estoque reprodutor da Estação. A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) calculada para Estação foi de 0,78 %.

#### **4.4. Caracterização da diversidade do DNAm das populações de Pirapitinga-do-sul na bacia do Paraíba-do-sul.**

As análises realizadas com os animais coletados no meio ambiente evidenciou 16 haplótipos (2, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 27), os quais não foram detectados entre os indivíduos que formam o estoque reprodutor da Estação.

As amostras provenientes do rio Preto (Visconde de Mauá - RJ) apresentaram os haplótipos 2, 7, 8, 9, 12, 18, 19 e 20, somente observados nesta região. Enquanto que no rio Paraibuna os haplótipos 6, 14 e 21 foram exclusivos desta localidade.

A distribuição dos haplótipos nos rios Negro e do Peixe foi similar àquela encontrada na Estação. Nestes dois rios foram evidenciados a presença de haplótipos heteroplásmicos. No rio Negro, a heteroplasmia está presente em 24,4% dos exemplares analisados. Já no rio do Peixe, a heteroplasmia foi observado em 15,8% dos indivíduos. Neste rio foi detectado o haplótipo 27, não observado em nenhuma localidade amostrada.

No rio Buquira, os 38 animais coletados apresentaram somente o haplótipo 1. Esta situação foi considerada atípica, pois levando-se em consideração que as capturas foram feitas em anos diferentes, pontos diferentes ao longo do rio e os animais capturados apresentavam peso superior a 200 grs, a possibilidade de todos serem provenientes de uma mesma desova torna-se bastante reduzida.

O rio Itagaçaba apresentou 3 haplótipos (1, 22 e 26) entre os 7 indivíduos amostrados, apesar de seriamente ameaçado quanto as condições mínimas de sustentação de uma ictiofauna.

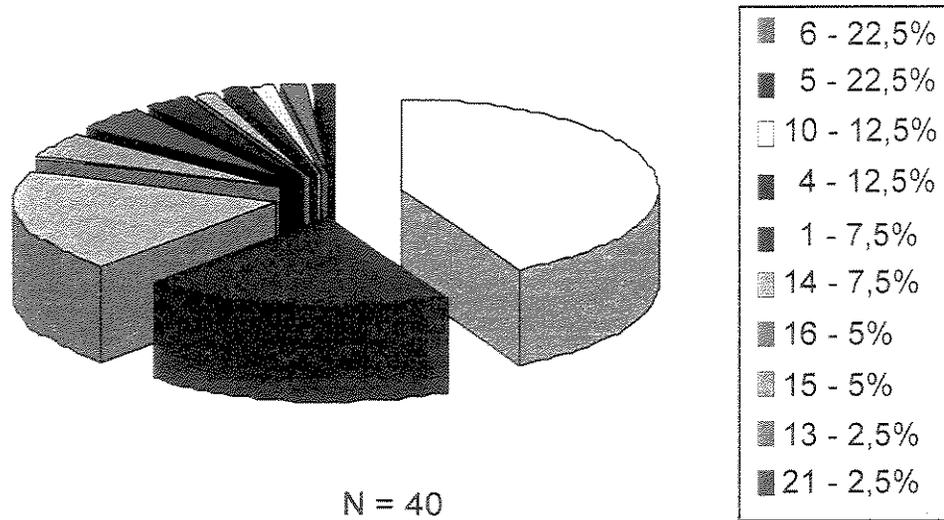
O rio Martins está em conexão sazonal com o rio Paraibuna. Conforme a variação de volume do reservatório de Paraibuna, o rio Martins pode ser um tributário do rio Paraibuna ou ficar isolado, tornando-se um contribuidor do Reservatório. A maioria dos haplótipos observado no rio Martins são encontrados na Estação, com exceção do haplótipo 13 encontrado nos rios Paraibuna e Preto. Nas Figuras 4.6 a 4.10 e Tabela 4.3 são descritas as freqüências relativas dos vários haplótipos mitocondriais nas diferentes populações de Pirapitinga-do-sul amostradas na bacia do rio Paraíba-do-Sul.

A distribuição dos haplótipos no meio ambiente evidenciou o haplótipo 1 como o mais freqüente, mesmo se não incluir a amostra proveniente do rio Buquira, da qual 100% dos indivíduos são pertencentes ao haplótipo 1.

A comparação entre os haplótipos encontrados e o haplótipo mais comum, mostrou que 8 haplótipos diferiram em 1 sítio de restrição, 0,32% de divergência nucleotídica do haplótipo 1; 12 diferiram em 2 sítios, (0,72%); 5 diferiram em 3 sítios, (0,51%) e 1 diferiu em 1 sítio (1,04%). A relação entre os 27 haplótipos mitocondriais representada pelo UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) (Figura 4.11) mostra que os haplótipos 4, 14, 25, 10, 15 estão mais correlacionados geneticamente entre si do que em relação aos demais haplótipos.

Os haplótipos encontrados tanto na Estação como no meio ambiente, com seus respectivos ganhos e perdas de sítios para as diferentes enzimas polimórficas, pode ser melhor compreendida na Figura 4.12. A distância genética relativa entre os pares de haplótipos pode ser determinado diretamente pelo método de parcimônia, contando-se o número de diferentes sítios entre os haplótipos.

## Rio Paraibuna



## Rio Martins

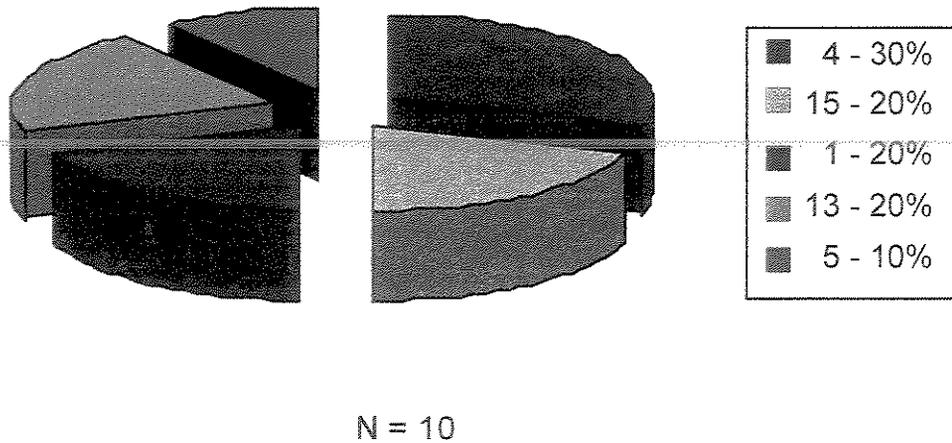
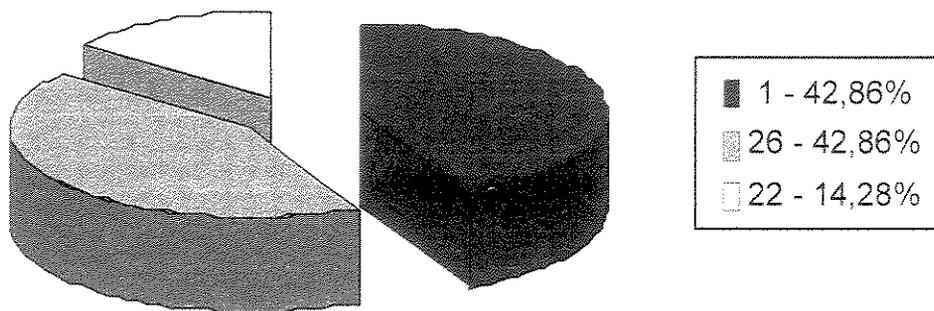


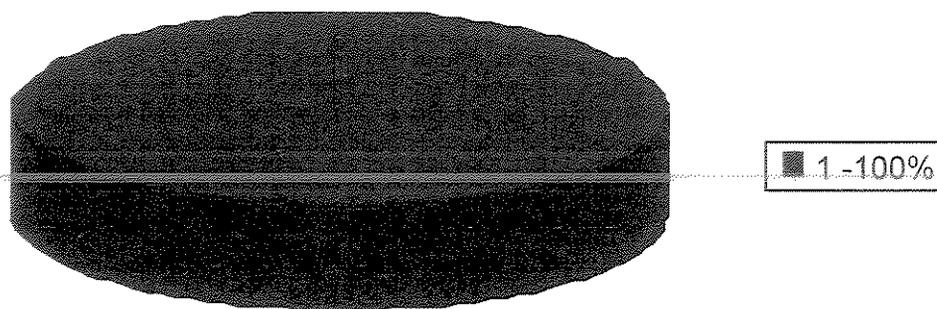
Figura 4.6. Frequências relativas dos vários haplótipos de DNA mitocondrial das populações amostradas no rios Paraibuna e Martins.

## Rio Itagaçaba



N = 7

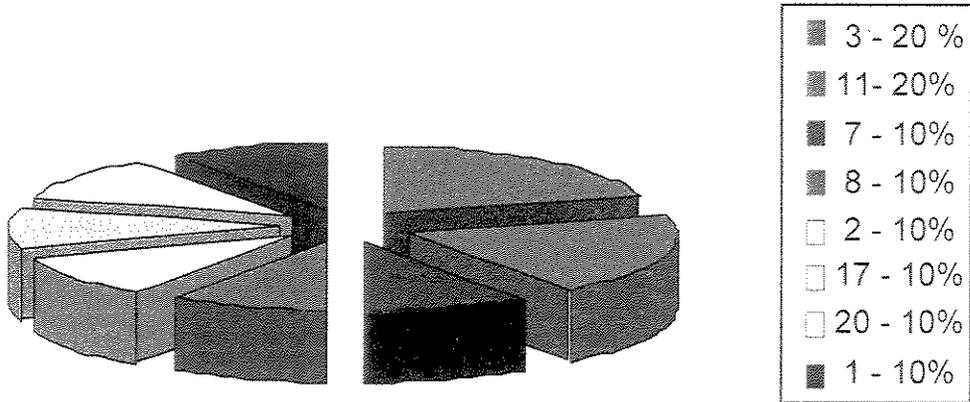
## Rio Buquira



N = 38

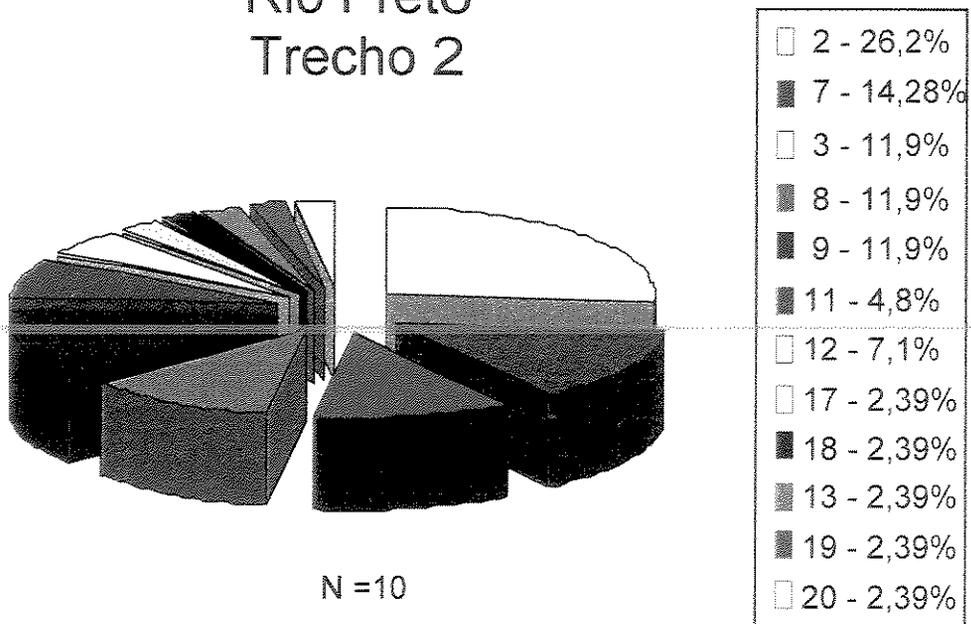
Figura 4.7. Frequências relativas dos vários haplótipos de DNA mitocondrial das populações amostradas nos rios Itagaçaba e Buquira

## Rio Preto Trecho 1



N = 42

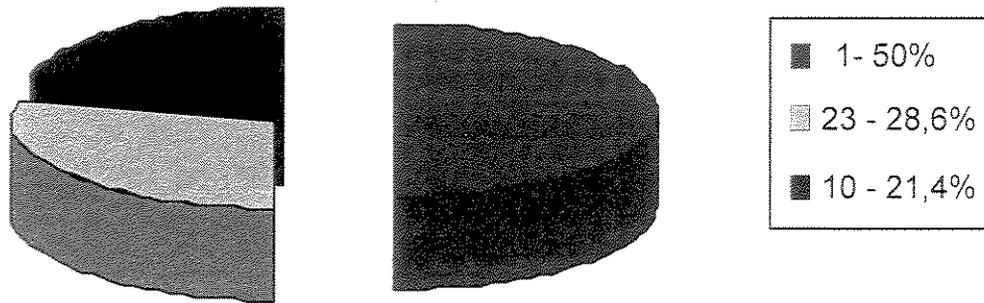
## Rio Preto Trecho 2



N = 10

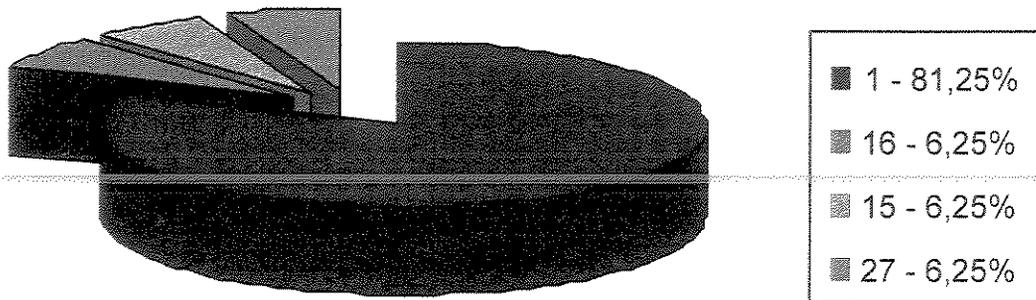
Figura 4.8. Frequências relativas dos vários haplótipos de DNA mitocondrial das populações amostradas no rio Preto (trecho 1 e trecho 2).

## Rio Negro



N = 28

## Rio do Peixe



N = 16

Figura 4.9. Frequências relativas dos vários haplótipos de DNA mitocondrial das populações amostradas nos rios Negro e do Peixe.

# Estação

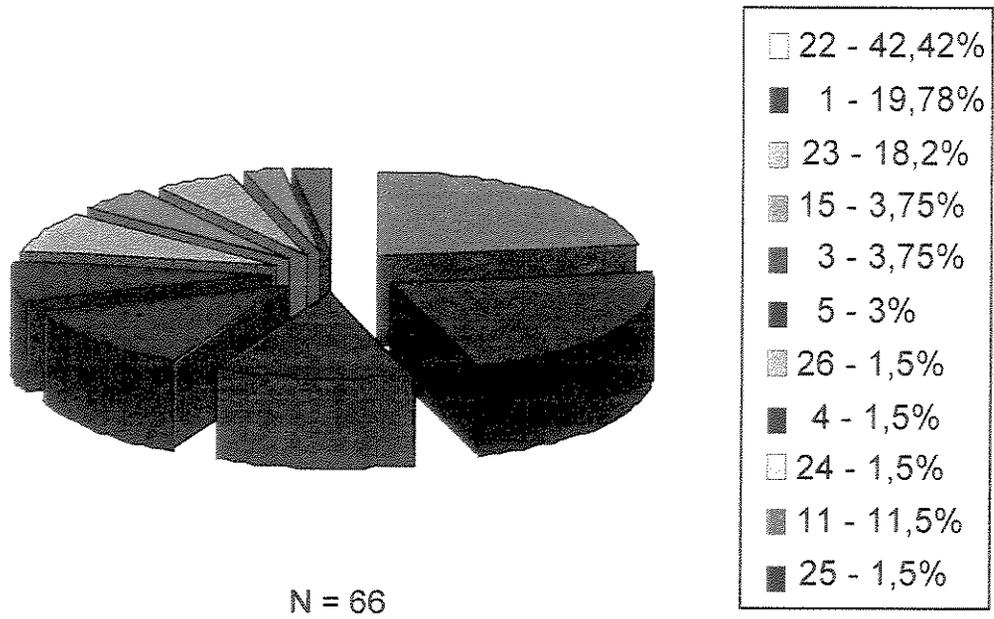


Figura 4.10. Frequências relativas dos vários haplótipos de DNA mitocondrial na Estação

Tabela 4.3. Distribuição dos haplótipos do DNA mitocondrial da Pirapitinga-do-sul na bacia do Paraíba-do-sul

<b>Localidades</b>									
Haplótipos	Estação	Paraibuna	Martins	Itagaçaba	Buquira	Preto-1	Preto-2	Negro	Peixe
1	13	3	2	3	38	-	1	14	13
2	-	-	-	-	-	11	1	-	-
3	3	-	1	-	-	5	2	-	-
4	1	5	3	-	-	-	-	-	-
5	2	9	-	-	-	-	-	-	-
6	-	9	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	6	1	-	-
8	-	-	-	-	-	5	1	-	-
9	-	-	-	-	-	5	-	-	-
10	-	5	-	-	-	-	-	6	-
11	1	-	-	-	-	2	2	-	-
12	-	-	-	-	-	3	-	-	-
13	-	1	2	-	-	1	-	-	-
14	-	3	-	-	-	-	-	-	-
15	3	2	2	-	-	-	-	-	1
16	-	2	-	-	-	-	-	-	1
17	-	-	-	-	-	1	1	-	-
18	-	-	-	-	-	1	-	-	-
19	-	-	-	-	-	1	-	-	-
20	-	-	-	-	-	1	1	-	-
21	-	1	-	-	-	-	-	-	-
22	28	-	-	1	-	-	-	-	-
23	12	-	-	-	-	-	-	8	-
24	1	-	-	-	-	-	-	-	-
25	1	-	-	-	-	-	-	-	-
26	1	-	-	3	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	1

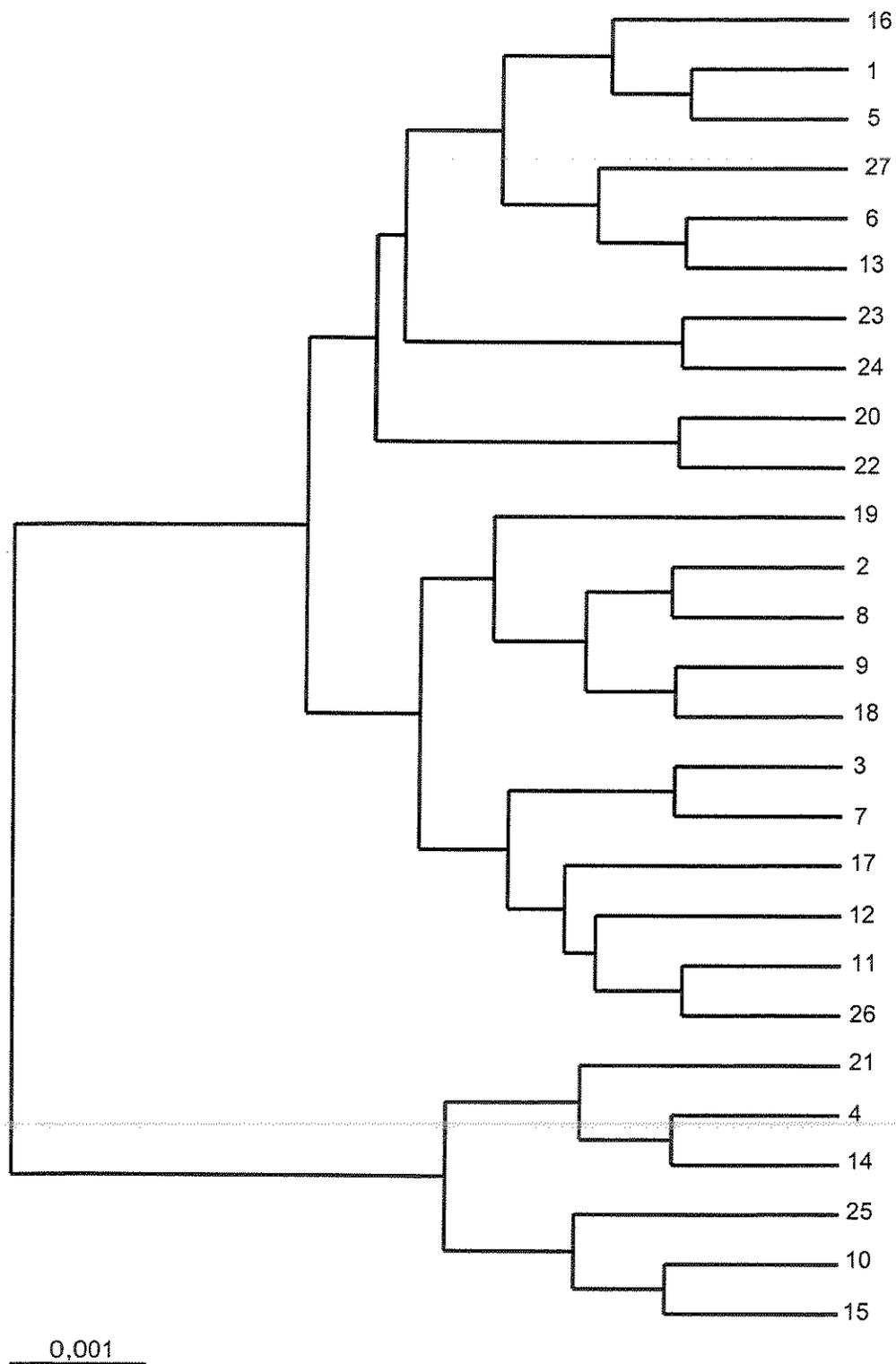


Figura 4.11. Dendrograma – UPGMA entre os haplótipos mitocondriais da Pirapitinga-do-sul baseado nas percentagens de divergência nucleotídicas. As designações dos haplótipos estão na tabela 4.2.

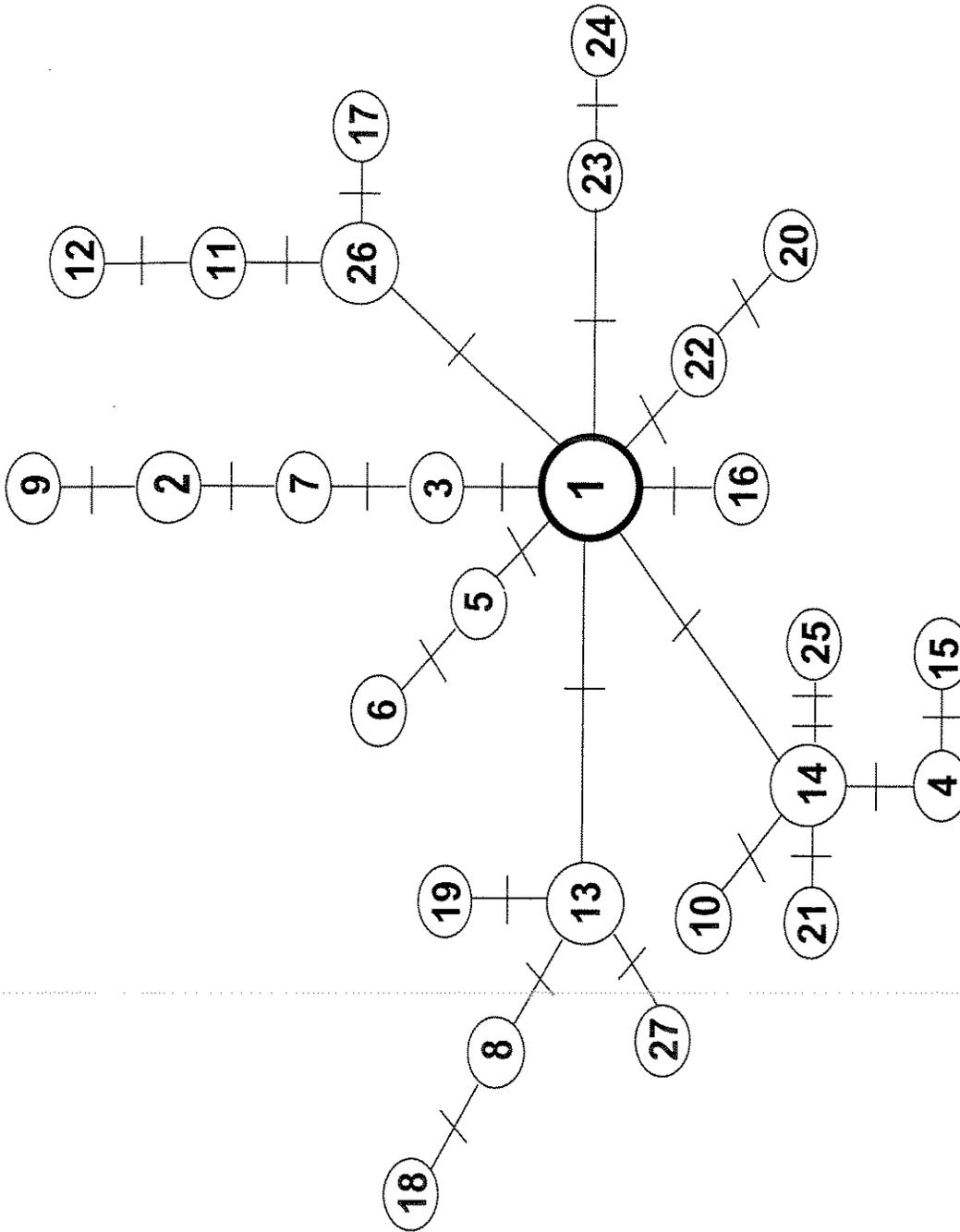


Figura 4.12 . Diagrama de parcimônia mostrando os ganhos e perdas dos sítios de restrição (traços no diagrama) entre os haplótipos de DNA mitocondrial da Pirapitinga-do-sul.

#### **4.5. Diversidade Haplotípica e Nucleotídica das populações selvagens de Pirapitinga-do-sul**

A diversidade haplotípica nas populações de Pirapitinga-do-sul variou conforme a localidade. No rio Preto, na área de coleta 1 foram identificados doze haplótipos diferentes, com um valor de diversidade haplotípica ( $h$ ) de 0,88, e na área 2 foram observados oito haplótipos, e um  $h = 0,95$ . O rio Paraibuna apresentou dez haplótipos e um  $h = 0,87$ . Já a coleta realizada no rio Buquira apresentou diversidade haplotípica igual a zero. Apesar da pouca amostragem e do estado de degradação do ecossistema adjacente ao rio Itagaçaba, três haplótipos, com um  $h = 0,71$ , foram identificados.

Os valores médios de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) entre as populações foi de 0,07471% ( $\pm 10^{-7}$ ).

#### **4.6. Divergência genética entre populações e estrutura das populações**

A variabilidade genética entre as populações foi estimada comparando-se os valores de distância genética entre os haplótipos observados (Tabela 4.4).

A divergência nucleotídica ( $\sigma$ ) média das populações, incluindo-se a da Estação, foi de 0,1726% ( $\pm 10^{-7}$ ). Todas as localidades amostradas apresentaram baixa divergência quando comparada com a população mantida na Estação. O rio Paraibuna apresentou um  $\sigma = -0,074\%$  e o Itagaçaba  $\sigma = 0,12\%$ . Estes valores estão de acordo com as informações sobre a formação do

estoque fundador da Estação, que foi formado em grande parte por animais provenientes destas duas localidades. A diferença maior de  $\sigma = 0,6\%$  entre a Estação e o rio Buquira, possivelmente foi devido à variabilidade haplotípica e nucleotídica nula observada nesta localidade.

Os rios Negro e Peixe apresentaram uma divergência baixa (0,24% e 0,48%, respectivamente) em relação a Estação, porém, mais alta que outras localidades. Esta observação é peculiar, visto que as duas regiões foram pontos de soltura de grande quantidade de alevinos e esperava-se grande similaridade entre estes dois pontos e a Estação.

As diferenças evolutivas entre as populações pela variação dos sítios de restrição podem ser avaliadas comparando-se os valores de divergência nucleotídica ( $\sigma$ ) entre as populações (Tabela 4.5). Estes valores de divergência nucleotídica ( $\sigma$ ) foram usados para gerar o dendrograma – UPGMA (Figura 4.13). De acordo com a distribuição das populações indicadas no dendrograma e de suas localizações geográficas, as populações amostradas no meio ambiente foram agrupadas em 5 regiões para avaliar a estrutura genética populacional pela análise de variância (AMOVA), da seguinte forma: A- rio Preto; B- rios Paraibuna, Itagaçaba e Martins; C- rio Negro, D- rio do Peixe e E- rio Buquira. Os valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e haplotípica ( $h$ ) bem como os de divergência nucleotídica ( $\sigma$ ) interpopulacional do conjunto de populações estão descritas na Tabela 4.5 e os resultados da estrutura genético populacional pela análise de variância (AMOVA) na Tabela 4.6.

Tabela 4.4- Divergência nucleotídica entre todos os pares de haplótipos. Erros padrões acima da diagonal, divergência abaixo. Designação dos haplótipos em negrito

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1	0,006	0,004	0,010	0,004	0,004	0,004	0,007	0,004	0,005	0,007	0,004	0,006	0,016	0,008	0,008	0,004	0,006	0,004	0,006	0,007	0,012	0,004	0,004	0,004	0,008	0,011	0,004	
2	0,008	0,004	0,006	0,007	0,008	0,016	0,005	0,011	0,009	0,004	0,009	0,007	0,007	0,007	0,007	0,005	0,004	0,007	0,006	0,008	0,007	0,007	0,007	0,006	0,010	0,005	0,005	
3	0,003	0,005	0,009	0,006	0,006	0,005	0,016	0,004	0,008	0,011	0,004	0,004	0,010	0,007	0,006	0,004	0,009	0,004	0,005	0,010	0,007	0,007	0,007	0,006	0,009	0,004	0,006	
4	0,011	0,008	0,008	0,011	0,009	0,007	0,007	0,005	0,004	0,007	0,006	0,008	0,005	0,016	0,011	0,007	0,006	0,009	0,007	0,005	0,009	0,012	0,008	0,006	0,006	0,007	0,007	
5	0,002	0,010	0,005	0,013	0,016	0,008	0,006	0,006	0,006	0,005	0,006	0,004	0,008	0,011	0,006	0,006	0,005	0,007	0,008	0,013	0,006	0,006	0,005	0,009	0,004	0,006		
6	0,005	0,008	0,008	0,016	0,003	0,007	0,006	0,004	0,009	0,007	0,004	0,011	0,006	0,009	0,006	0,008	0,004	0,006	0,007	0,010	0,006	0,006	0,005	0,011	0,004	0,006		
7	0,005	0,003	0,003	0,005	0,008	0,010	0,004	0,010	0,009	0,009	0,004	0,004	0,008	0,009	0,006	0,004	0,011	0,005	0,004	0,009	0,006	0,006	0,007	0,009	0,006	0,006		
8	0,005	0,003	0,003	0,011	0,008	0,005	0,005	0,004	0,010	0,009	0,004	0,004	0,008	0,009	0,006	0,004	0,011	0,005	0,004	0,009	0,006	0,006	0,006	0,005	0,012	0,004	0,007	
9	0,010	0,003	0,008	0,011	0,013	0,010	0,005	0,005	0,007	0,004	0,016	0,006	0,006	0,006	0,006	0,005	0,006	0,005	0,006	0,005	0,006	0,006	0,006	0,007	0,007	0,006	0,004	
10	0,010	0,008	0,013	0,005	0,013	0,011	0,011	0,011	0,011	0,007	0,006	0,008	0,016	0,005	0,008	0,007	0,007	0,012	0,007	0,006	0,006	0,008	0,007	0,005	0,006	0,006	0,007	
11	0,005	0,008	0,003	0,011	0,007	0,010	0,005	0,005	0,005	0,016	0,005	0,004	0,007	0,006	0,005	0,005	0,016	0,004	0,004	0,004	0,007	0,006	0,006	0,006	0,007	0,007	0,004	0,005
12	0,008	0,005	0,005	0,008	0,010	0,013	0,003	0,008	0,003	0,013	0,003	0,013	0,003	0,005	0,007	0,005	0,006	0,007	0,004	0,005	0,006	0,007	0,007	0,009	0,007	0,007	0,004	0,005
13	0,003	0,005	0,005	0,013	0,005	0,003	0,008	0,003	0,008	0,008	0,008	0,010	0,007	0,010	0,004	0,005	0,004	0,007	0,006	0,009	0,009	0,004	0,004	0,004	0,004	0,010	0,009	0,004
14	0,008	0,011	0,011	0,003	0,010	0,013	0,008	0,013	0,013	0,003	0,013	0,011	0,010	0,004	0,009	0,008	0,007	0,009	0,009	0,009	0,007	0,007	0,010	0,007	0,004	0,006	0,006	
15	0,013	0,006	0,011	0,003	0,016	0,014	0,008	0,008	0,008	0,003	0,013	0,011	0,010	0,005	0,009	0,007	0,007	0,010	0,006	0,005	0,007	0,009	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,009
16	0,002	0,010	0,005	0,013	0,005	0,007	0,008	0,008	0,013	0,013	0,007	0,010	0,005	0,010	0,016	0,006	0,005	0,007	0,008	0,013	0,006	0,006	0,005	0,009	0,004	0,006		
17	0,008	0,011	0,005	0,014	0,010	0,013	0,008	0,008	0,008	0,019	0,003	0,005	0,010	0,016	0,016	0,010	0,004	0,009	0,006	0,007	0,007	0,007	0,007	0,009	0,007	0,007	0,006	
18	0,008	0,005	0,005	0,013	0,010	0,008	0,008	0,003	0,003	0,013	0,003	0,005	0,005	0,016	0,011	0,010	0,005	0,004	0,004	0,004	0,007	0,005	0,005	0,006	0,008	0,004	0,006	
19	0,008	0,006	0,005	0,014	0,010	0,008	0,008	0,003	0,008	0,014	0,008	0,011	0,005	0,017	0,011	0,010	0,005	0,006	0,008	0,007	0,007	0,007	0,007	0,006	0,014	0,005	0,009	
20	0,005	0,008	0,003	0,005	0,008	0,010	0,005	0,005	0,011	0,011	0,005	0,008	0,008	0,017	0,011	0,010	0,005	0,008	0,008	0,008	0,008	0,009	0,005	0,009	0,007	0,009	0,006	0,007
21	0,014	0,011	0,011	0,003	0,016	0,019	0,008	0,014	0,014	0,008	0,014	0,011	0,017	0,005	0,006	0,016	0,011	0,016	0,011	0,008	0,010	0,014	0,008	0,008	0,008	0,008	0,009	
22	0,003	0,011	0,005	0,008	0,005	0,008	0,008	0,008	0,013	0,008	0,008	0,011	0,005	0,005	0,011	0,010	0,011	0,003	0,011	0,007	0,006	0,006	0,007	0,006	0,007	0,004	0,006	
23	0,003	0,011	0,005	0,014	0,005	0,008	0,008	0,008	0,013	0,013	0,008	0,011	0,005	0,011	0,017	0,005	0,011	0,010	0,011	0,008	0,017	0,005	0,011	0,007	0,011	0,007	0,004	0,006
24	0,005	0,013	0,008	0,016	0,007	0,010	0,011	0,010	0,011	0,016	0,005	0,008	0,013	0,019	0,007	0,008	0,008	0,013	0,011	0,008	0,017	0,005	0,011	0,007	0,011	0,007	0,004	0,006
25	0,013	0,011	0,017	0,008	0,016	0,014	0,014	0,014	0,014	0,003	0,019	0,016	0,011	0,005	0,006	0,016	0,023	0,017	0,018	0,014	0,011	0,011	0,011	0,013	0,006	0,004	0,005	
26	0,002	0,010	0,005	0,013	0,005	0,007	0,008	0,008	0,008	0,013	0,002	0,005	0,005	0,010	0,016	0,005	0,005	0,010	0,008	0,016	0,005	0,005	0,005	0,002	0,016	0,007	0,009	
27	0,005	0,003	0,008	0,011	0,008	0,005	0,005	0,005	0,010	0,008	0,003	0,008	0,003	0,008	0,008	0,013	0,008	0,013	0,008	0,011	0,014	0,008	0,008	0,010	0,008	0,010	0,008	0,008

Tabela 4.5 – Índices de variabilidade das populações de Pirapitinga-do-sul. Na tabela está representado a Diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) intrapopulacional, em negrito na diagonal (%); a divergência nucleotídica ( $\sigma$ ) interpopulacional abaixo da diagonal e o valores de diversidade haplotípica (h) na margem direita.

	Estação	Paraibuna	Martins	Itagaçaba	Buquira	Preto-1	Preto-2	Negro	Peixe	h
Estação	<b>0,785</b>									0,7534
Paraibuna	-0.000736	<b>0,774</b>								0,8718
Martins	0.000703	0.000625	<b>0,735</b>							0,8667
Itagaçaba	0.001228	-0.001284	-0.000558	<b>1,094</b>						0,7143
Buquira	0.006516	0.002096	0.002993	0.004016	<b>0</b>					0,0000
Preto-1	0.001821	0.003037	0.001512	0.000733	0.004186	<b>0,425</b>				0,8792
Preto-2	0.001022	0.002122	0.001206	-0.000589	0.002129	0.000329	<b>0,501</b>			0,9556
Negro	0.002381	-0.000528	0.001008	0.002053	0.002197	0.002938	0.001865	<b>0,606</b>		0.6455
Peixe	0.004775	0.001317	0.002111	0.002506	0.000064	0.003335	0.001575	0.00143	<b>0,249</b>	0.3500

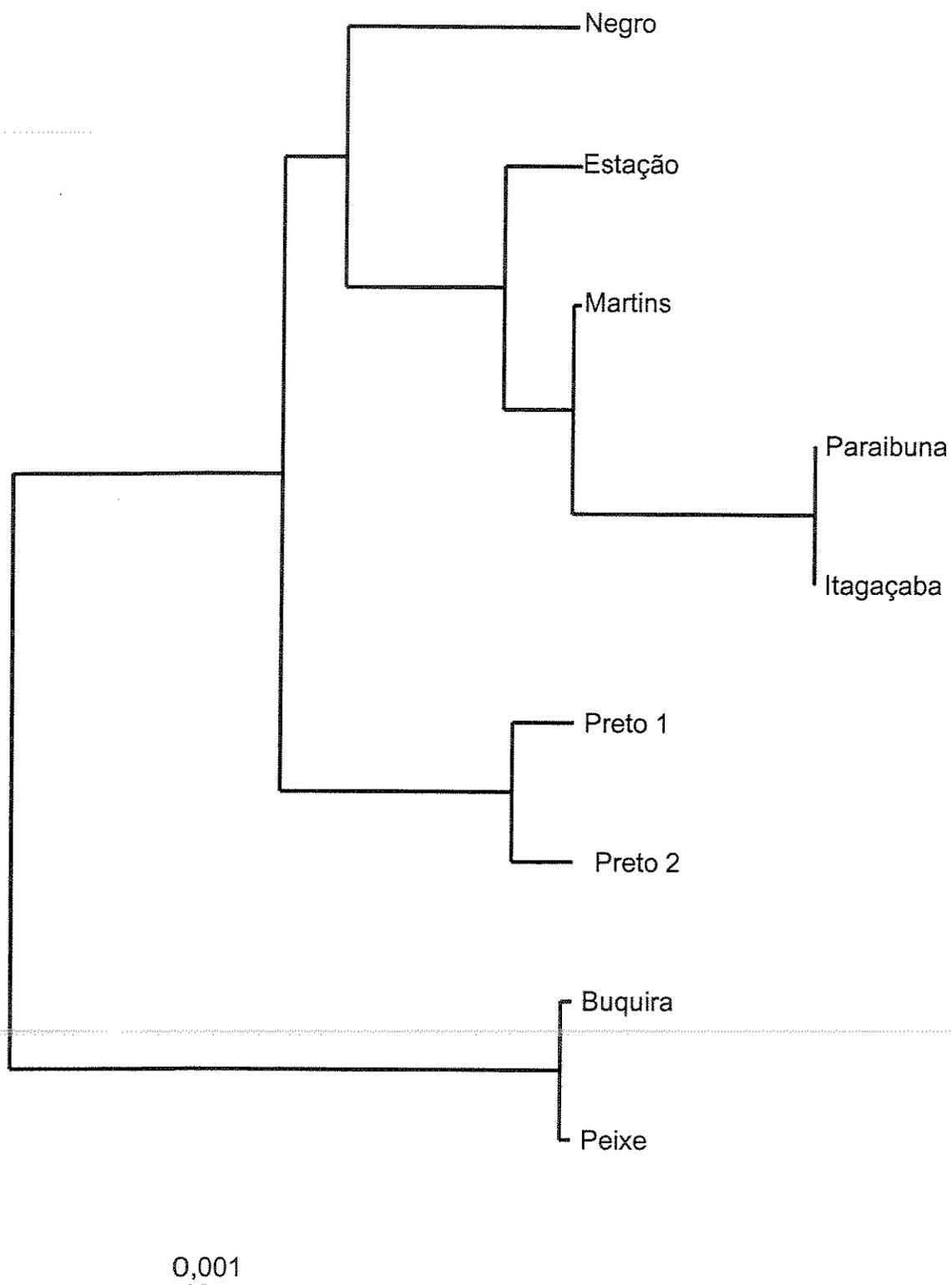


Figura 4.13. Dendrograma – UPGMA da divergência nucleotídica do DNA mitocondrial entre as populações de Pirapitinga-do-sul na bacia do Paraíba-do-sul e o estoque da Estação de Aqüicultura de Paraibuna – CESP.

Tabela 4.6. Análise da estrutura genético populacional das populações de Pirapitinga-do-sul na bacia do Paraíba-do-sul pela método AMOVA.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	% de Variação
Entre grupos	4	19,61	0,071 Va	15,97
Entre populações dentro dos grupos	2	2,25	0,062 Vb	14,01
Dentro das populações	184	57,11	0,31 Vc	70,02
Total	190	78,97	0,0433	

#### Índices de fixação

FST = 0,299

FSC = 0,166

FCT = 0,159

#### Teste de significância (1023 permutações)

Vc e FST :  $P = 0,00 \pm 0,00$

Vb e FSC :  $P = 0,00 \pm 0,00$

Va e FCT :  $P = 0,1613 \pm 0,0129$

## V. DISCUSSÃO

### 5.1. Características do DNA mitocondrial da Pirapitinga-do-sul

Os genomas mitocondriais em peixes variam muito pouco em tamanho. Entre 47 espécies de diversas famílias, o tamanho do DNA variou de 15,2 a 19,8 kb (Billington & Hebert, 1991). Com base em análises da variabilidade do DNAm<sub>t</sub> estimou-se um tamanho de 16,300 pb ( $\pm 500$ ) para Pirapitinga-do-sul. Esta estimativa corrobora com os dados de tamanho de DNAm<sub>t</sub> obtidos para outras espécies de peixes.

Variações em tamanho do DNAm<sub>t</sub> entre espécies relacionadas filogeneticamente estão descritas na literatura (Beckwitt & Petruska, 1985). Entretanto, apesar do grande número de espécies e a ampla distribuição do gênero *Brycon*, não há referências de estudos com outras espécies do gênero em questão que possibilitem uma comparação dos tamanhos do DNAm<sub>t</sub> entre espécies deste gênero.

Estudos sobre a variabilidade do DNAm<sub>t</sub> em animais têm demonstrado que o polimorfismo intraespecífico é comum; e que a homoplasmia, isto é, a presença de somente um tipo de DNAm<sub>t</sub> no organismo, é geralmente encontrada na maioria dos DNAs mitocondriais em animais. Todavia, a heteroplasmia de tamanho de molécula tem sido evidenciada em diferentes espécies de *Drosophila* (Fauron & Wolstenholme, 1980) e anfíbios (Bermingham *et al.*, 1986). Em peixes, este tipo de heteroplasmia foi identificada em diversos gêneros (Buroker *et al.*, 1990; Chapman, 1987). Nas

avaliações realizadas com o DNAmT da Pirapitinga-do-sul, não foi observada heteroplasmia de tamanho. Porém, em animais provenientes da Estação e dos rios do Peixe e Negro, onde foram introduzidos animais por repovoamento, foi identificado um padrão de polimorfismo típico de uma heteroplasmia de sítio de restrição.

O padrão apresentado por animais com heteroplasmia de sítio de restrição evidenciou a presença dos tipos A e B para a enzima *Nhe* I. Estes indivíduos apresentaram os fragmentos de 1180 pb (padrão A) e 1260 pb (padrão B) juntos em um mesmo indivíduo. Contudo, este padrão de heteroplasmia poderia ter sido gerado por uma digestão incompleta ou mesmo por uma possível contaminação das amostras. Com o objetivo de certificar a presença ou não de uma possível heteroplasmia de sítio de restrição, amostras provenientes de padrões heteroplásmicos foram submetidas a digestões com concentrações crescentes da enzima *Nhe* I e a incubações prolongadas. Mesmo com incubações de 3 a 4 h, e concentrações da enzima maiores que aquelas recomendadas pelos fabricantes, as duas bandas de 1180 (A) e 1260 (B), foram novamente observadas, sem mudanças em suas intensidades quando comparadas com as digestões dos padrões A e B separadamente. Uma possível digestão incompleta nas amostras apresentaria diferenças de intensidades entre as bandas de 1180 (A) e 1260 (B), o que poderia ser o produto de digestões intermediárias. Nenhuma outra evidência de digestão incompleta, como por exemplo, a presença de fragmentos adicionais, foi observada nas diversas amostras de DNAmT testadas. Desta forma, pode-se

constatar a presença de heteroplasma de sítio de restrição na espécie *Brycon opalinus* com a enzima *Nhe I*.

Ao contrário da heteroplasma de tamanho da molécula, a heteroplasma de sítio de restrição não tem sido observada com freqüência em peixes. Outros casos deste tipo de heteroplasma podem não estar sendo identificados, pois a observação de tal condição pode ser confundida com uma digestão incompleta, e sua identificação envolve a diferença de um sítio de restrição, o que somente pode ser observado pela ação de uma única enzima.

Betzen *et al.*, (1988) evidenciaram heteroplasma de sítio de restrição em 10 exemplares da espécie *Alosa sapidissima* (*American Shad*). No trabalho, indivíduos com heteroplasma apresentaram uma ampla distribuição geográfica; condição tal que levou os autores a proporem que a heteroplasma de sítio de restrição pode ser um fenômeno possível também em outras espécies.

O fenômeno de heteroplasma de sítio de restrição nos exemplares de Pirapitinga-do-sul pode ter se originado em uma linhagem de células germinativas por um evento mutacional independente e conseqüente segregação incompleta das duas formas A e B, produzidas pela enzima *Nhe I*. Outra hipótese é uma possível herança biparental, que por ocorrer a uma taxa bem baixa (1 em 1000 moléculas) é menos provável, já que a contribuição paterna do DNAm<sub>t</sub> é raramente fixado ao conjunto das mitocôndrias presentes nos oócitos em animais (Chapman *et al.*, 1982). No entanto, a universalidade e a taxa de contribuição do DNAm<sub>t</sub> está ainda por ser melhor compreendida (Gyllensten *et al.*, 1991).

De acordo com Birky (1983) a heteroplasmia é um fenômeno comumente encontrado em linhagens de células germinativas, e somente torna-se evidente em linhagens somáticas quando mais de uma molécula do DNAm<sub>t</sub> se estabelece durante a diferenciação embrionária. No caso da Pirapitinga-do-sul a heteroplasmia de sítio de restrição não está confinada apenas às células germinativas, estando presente também nas somáticas, pois o DNAm<sub>t</sub> foi extraído de tecido muscular esquelético. Portanto, apesar de estar em baixa frequência, a heteroplasmia de sítio de restrição tem sido perpetuada no estoque reprodutor da Estação e transmitida ao longo das gerações, como pode ser comprovada pela sua presença em locais de repovoamento.

## **5.2. Caracterização genética do estoque reprodutor da Estação de Aqüicultura e Hidrobiologia de Paraibuna – CESP.**

A caracterização genética e a capacidade de discriminar os estoques mantidos em cativeiro são etapas importantes em programas que objetivam a introdução de novas populações no meio ambiente por meio de programas de repovoamento. Desta forma, os critérios para a formação do estoque fundador é de fundamental importância para a manutenção da variabilidade genética a longo prazo.

A utilização de um número efetivo pequeno de animais no processo de formação do estoque fundador resulta em uma perda gradativa da variabilidade genética. Vuorinen (1984) demonstrou que a perda de variabilidade genética entre reprodutores de truta marron (*Salmon trutta*), depois de 16 anos da

formação do estoque fundador, foi devida ao baixo número de indivíduos utilizados, à deriva genética e a processos inadequados de seleção. Verspoor (1988) também verificou um decréscimo na variabilidade genética já na primeira geração de salmão do atlântico (*Salmon salar*) em cativeiro, quando comparado com os selvagens.

Poucos são os registros sobre a formação do estoque fundador da Estação de Aqüicultura e Hidrobiologia de Paraibuna - CESP. Informações provenientes dos funcionários mais antigos da Estação indicam a contribuição de três localidades para formação do plantel da Estação: rio Paraibuna, rio Itagaçaba e rio do Salto. Destas três localidades, atualmente não há evidências da presença de populações de Pirapitinga-do-sul no rio do Salto, provavelmente extintas pela intensa deterioração ambiental ao longo de grande parte do rio.

O estoque presente hoje na Estação de reprodutores, cerca de 700 indivíduos, foi formado ao longo dos últimos 18 anos, no entanto não há registros do número efetivo de indivíduos utilizados na formação inicial do estoque fundador.

Dos 27 haplótipos identificados nas populações de Pirapitinga-do-sul, 13 estão presentes na Estação. A ausência de avaliações anteriores, com o uso do DNAm, não permite uma avaliação da estabilidade temporal na composição dos haplótipos desde a formação do estoque reprodutor.

Dois haplótipos, 24 e 25, apesar de estarem em baixa frequência relativa na Estação (1,25% cada), não foram encontrados nas amostras provenientes das populações selvagens. Isto sugere que estes dois haplótipos fizeram parte

da constituição genética do rio do Salto ou são haplótipos já extintos do rio Itagaçaba, sendo que ambas localidades foram locais de coleta para formação do estoque fundador da Estação. Assim, estes dois haplótipos podem, atualmente, ser considerados como "linhagens" exclusivas da Estação e devem ser separados para serem usados como marcadores em futuros projetos de repovoamento.

Os índices de divergência nucleotídica ( $\sigma$ ) entre a Estação e os rios Paraibuna e Itagaçaba foram baixos; -0,0007 e 0,0012, respectivamente. Estes baixos níveis de distância genética corroboram a origem de parte do estoque reprodutor presente na Estação, possivelmente com uma maior contribuição da população do rio Paraibuna, pois o valor negativo da divergência nucleotídica sugere que as populações da Estação e do rio Paraibuna devam ser consideradas como uma população única.

A diversidade haplotípica ( $h$ ) encontrada na Estação foi de 0,75. Este valor não é considerado baixo quando comparado com os valores obtidos para as populações em ambiente natural (Tabela 4.5), e indica o grau de variabilidade intrapopulacional. Baixas diversidades haplotípicas são comuns em estoques reprodutores em estações de piscicultura. Gyllensten & Wilson, (1987) detectaram um valor  $h=0$  em linhagens de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Além disso, numa comparação de 6 estoques em cativeiro com 8 populações naturais de truta marron (*Salmon trutta*), observaram reduções na variabilidade do DNAm entre os indivíduos em cativeiro ( $h=0.2$ ), quando

comparado com as populações selvagens ( $h=0,7$ ), o que sugere a ocorrência de um efeito fundador na formação do plantel de reprodutores.

O valor de diversidade nucleotídica calculado entre os 13 haplótipos presentes na Estação ( $\pi = 0,78\%$ ) está dentro dos valores encontrados entre peixes de água doce, que variam de 0 a 2% (Danzmann *et al.*, 1991). Os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica não são considerados baixos, por isso, levam a supor que a formação do estoque fundador na Estação de Aqüicultura de Paraibuna – CESP foi grande o suficiente, ou seja, com um tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) maior que 100 indivíduos (Ferguson *et al.*, 1991). Este fato evitou um possível efeito fundador, pelo menos no seu início, o qual reduziria a variabilidade genética.

Apesar dos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica não estarem em níveis baixos, se comparados com outros índices detectados em peixes de água doce, dados provenientes de eletroforese de proteína (transferrina plasmática) apresentaram índices de consangüinidade elevados ( $F= 0,421$ ) (Toledo-Filho, 1994). Assim, pode-se supor que, mesmo com uma relativa variabilidade presente no DNAm, uma possível redução da heterozigose, mesmo que representada por apenas um locus, pode ser um indicativo de perda de variabilidade genética no estoque reprodutor mantido atualmente na Estação.

Os programas de repovoamento com a Pirapitinga-do-sul promovidos pela CESP de Paraibuna teve seu início em 1984 com a introdução de alevinos

na represa. De 1984 a 1987, cerca de 470.000 alevinos foram soltos no reservatório.

Esta prática de repovoamento não obteve resultados satisfatórios já que não há registros de captura da espécie em pescas experimentais e esportivas no corpo do reservatório (CESP, 1996). A ausência da espécie no reservatório evidencia a não adaptação da Pirapitinga-do-sul às condições de ambiente lântico da represa.

A partir de 1988 iniciou-se a introdução de alevinos de Pirapitinga-do-sul em diversos rios contribuintes do reservatório. Muitos desses rios estão localizados no alto do Paraíba e eram tributários dos rios Paraibuna e Paraitinga antes da formação do reservatório. A presença da Pirapitinga-do-sul no rio Paraibuna e em alguns de seus tributários não atingidos pelo enchimento do reservatório é um indicativo da presença anterior da espécie nos rios contribuintes do reservatório.

Com a formação da represa de Paraibuna as populações de Pirapitinga-do-sul tornaram-se isoladas pelo reservatório. Esta nova condição somada à intensa destruição ambiental levou ao desaparecimento de possíveis populações da Pirapitinga-do-sul nestes rios.

Em 1992, após avaliações quanto à qualidade da água, presença de vegetação marginal e aquática e por apresentarem características distintas, os rios do Peixe e Negro foram selecionados para se verificar a efetividade do repovoamento. Foram introduzidos 75.000 alevinos com um comprimento médio de 3,6 cm (46 dias de idade) no rio do Peixe e 15.000 alevinos com um

comprimento médio de 3,1 cm (36 dias de idade) no rio Negro (Girardi *et al.*, 1995).

A presença de heteroplasma de sítio em animais da Estação e a evidência de animais portadores de padrões com heteroplasma nestes dois rios sugerem que os alevinos de Pirapitinga-do-sul sobreviveram e tiveram sucesso reprodutivo no novo ambiente. Assim, apesar da heteroplasma tender ao desaparecimento com a segregação dos padrões de restrição presentes, na presente situação, o fenômeno pode ser utilizado como um "marcador", pois foi detectado nos dois rios usados para repovoamento. Os valores baixos de diversidade nucleotídica ( $\pi=0,25\%$ ) e haplotípica ( $h=0,35$ ) para o rio do Peixe possivelmente foi resultado do efeito fundador no momento do repovoamento. Isto pode ser explicado primeiramente pela quantidade de alevinos introduzidos no rio do Peixe, que foi menos da metade da quantidade do rio Negro. Já os valores de diversidade haplotípica ( $h=0,64$ ) e nucleotídica ( $\pi = 0,6\%$ ) para o rio Negro foram menores que os encontrados na Estação ( $h=0,75$ ;  $\pi = 0,78$ ).

A composição haplotípica do rio Negro e do Peixe evidenciou dados interessantes. No rio Negro, aparentemente em melhor estado de conservação, além dos haplótipos heteroplásmicos, apenas 3 haplótipos foram detectados. Dos três (1, 10 e 23), o haplótipo 10 não está presente na Estação e é encontrado no rio Paraibuna. Já no rio do Peixe, com poucos trechos de mata ciliar e aparentemente menos conservado, também com exceção da

heteroplasmia, foram identificados 4 haplótipos. Dos quatro (1, 15, 16 e 27), o haplótipo 16 não está presente na Estação e é encontrado no rio Paraibuna.

A presença de haplótipos compartilhados entre o rio Paraibuna e os rios Negro e do Peixe pode significar a presença anterior da Pirapitinga-do-sul nestes rios, pois os rios do Peixe e Negro eram tributários do rio Paraibuna antes da formação do reservatório. Desta forma, apesar das informações da equipe técnica da Estação de Aqüicultura e Hidrobiologia de Paraibuna, de que levantamentos ictiológicos constataram a ausência da espécie nos rios em questão, é possível que as populações residentes estivessem em número reduzido, não tendo sido possível sua detecção.

Com base em dados obtidos pela composição haplotípica do DNAMt dos dois rios pode-se supor que a introdução de alevinos em projetos de repovoamento em rios contribuintes do reservatório pode ser uma prática efetiva, uma vez combinada com medidas conservacionistas que objetivem a manutenção das condições de vida nos rios.

### **5.3. Variabilidade do DNAMt e estrutura genético populacional da Pirapitinga-do-sul na bacia do rio Paraíba do Sul.**

Dos 27 haplótipos evidenciados pelo *RFLP* do DNAMt da Pirapitinga-do-sul na bacia hidrográfica do Vale do Paraíba, o haplótipo 1 foi encontrado com maior frequência, o que sugere uma possível ancestralidade deste haplótipo com relação aos demais haplótipos observados.

A análise das distâncias genéticas entre os 27 haplótipos forneceu indícios dos caminhos evolutivos do DNAmT da espécie em questão (Figuras 4.11 e 4.12). Haplótipos com alto grau de similaridade genética indicam uma origem recente do haplótipo ancestral comum. Já divergências mais amplas sugerem um tempo maior de evolução.

Divergências intraespecíficas entre haplótipos mitocondriais em peixes podem variar, por exemplo, com o ambiente em que vivem. Peixes de água doce geralmente apresentam índices de divergência entre haplótipos maiores (10%) que em peixes de águas salobras (2%) e marinhas (4,4%) (Billington & Herbert, 1991).

Estudos publicados com peixes de água doce têm-se concentrado em espécies do hemisfério norte, poucos têm sido os trabalhos publicados com espécies das bacias da América neotropical. Calcagnotto, (1998) apresentou dados de divergência genética variando de 0,26 a 0,76% entre pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e de 0,28 a 0,68% entre tambaquís (*Colossoma macropomum*).

O padrão e a taxa de divergência intraespecífica entre haplótipos mitocondriais em peixes dependem do tipo de habitat, da dispersão larval, além da taxa de migração das populações, podendo ser também bastante influenciados pelos eventos geológicos ocorridos na área de endemismo da espécie.

Peixes nativos de regiões submetidas a períodos de intensa glaciação apresentam valores de divergência genética mais reduzida, o que

possivelmente ocorre devido à redução do número de indivíduos (efeito gargalo) sobre as populações ancestrais. No entanto, espécies localizadas mais ao sul dos EUA, possivelmente com um período glacial menos intenso, apresentaram maior retenção dos haplótipos, com valores de divergência haplotípica mais elevados (10%) (Bermingham & Avise, 1986).

A divergência média entre os 27 haplótipos evidenciados para a Pirapitinga-do-sul na bacia do Paraíba foi de 0,825%. Este valor está dentro dos valores médios de 0 a 2% obtidos para a grande maioria dos peixes de água doce já investigados. Pode se considerar que este valor não seja tão baixo, pois a distribuição geográfica da espécie é relativamente pequena, estando presente em alguns rios de cabeceira e sendo endêmica da bacia do Paraíba do Sul.

Assumindo 2% de divergência por 1 milhão de anos de separação entre os haplótipos mitocondriais (Brown *et al.*, 1979), estima-se que a separação entre os haplótipos mais divergentes (15, 21 e 25) em relação ao haplótipo mais comum (1), tenha ocorrido a cerca de 680.000 anos. Este tempo excede os cinco grandes ciclos de glaciação durante o Pleistoceno, os quais ocorreram durante os últimos 500 mil anos. Isto sugere que o haplótipo mais comum esteve presente nas áreas amostradas muito antes da última grande glaciação, período de Wisconsin-Würm que terminou a 10 mil anos.

A diversidade haplotípica calculada para algumas espécies de peixes tem variado, por exemplo, de 0,26 a 0,90 (Bernatchez & Dondson, 1990) até valores de  $h = 0,99$  em *Brevoortia tyrannus* (*American menhaden*) (Bowen & Avise, 1990).

O genoma mitocondrial da Pirapitinga-do-sul apresentou uma diversidade haplotípica média de  $h=0,62$ . Esta média foi reduzida pela ausência total de variabilidade haplotípica dos animais coletados no rio Buquira, pois nesta localidade todos os indivíduos coletados apresentaram o haplótipo 1.

Esta variabilidade nula do DNAm<sub>t</sub> indica uma forte redução populacional (efeito gargalo) ocorrido em algum momento no passado. Este estrangulamento populacional pode ter sido acentuado por uma menor variabilidade dos estoques originais, e que se reduziram com a eliminação das matas ciliares e assoreamento das áreas de reprodução. Apesar deste quadro, informações obtidas no local de captura constam que cardumes de Pirapitinga-do-sul têm sido vistos em todos os anos subindo o rio para desova. É importante salientar que o trecho do rio Buquira, onde o fenômeno da Piracema tem sido observado, vem sendo recuperado com a reconstituição de longos trechos de matas ciliares.

A relação entre conservação ambiental e manutenção da variabilidade haplotípica já foi descrita para populações de Esturjões (*Acipenser transmontanus*) (Brown *et al.*, 1992) e *Brown bullhead* (*Americus nebulosus*) (Murdoch & Hebert, 1994) e está de acordo com os valores obtidos para Pirapitinga-do-sul. O rio Negro apresenta-se em excelente estado de conservação e o valor de diversidade haplotípica é de 0,89. O mesmo acontece com o rio Paraibuna que apresentou um  $h= 0,86$ . No rio Itagaçaba o  $h= 0,71$  foi de certa forma surpreendente, pois o rio apresenta-se em avançado estado de deterioração. Os 7 exemplares capturados estavam concentrados em um trecho

divergência genética entre as populações. Isto parece ser o que vem ocorrendo com a Pirapitinga-do-sul, pois a divergência nucleotídica média entre as populações avaliadas foi de 0,18%.

Na análise de variância (AMOVA) constatou-se que, apesar da variação estar concentrada em grande parte dentro das populações (70,02%), verifica-se uma variação positiva (15,97%) entre populações. Esta variação positiva entre as populações indica uma estruturação genética da Pirapitinga-do-sul na bacia do Paraíba do Sul.

A disposição geográfica dos rios amostrados no presente trabalho, aliado aos dados de divergência nucleotídica e a evidência de estruturação genética das populações caracterizam a distribuição da Pirapitinga-do-sul dentro da Categoria III proposta por *Avise et al.*, (1987). Nesta categoria filogeográfica, as populações ocupam regiões geográficas distintas, isto é, não ocorrem juntas ou sobrepostas. Porém, possuem pouca diferenciação genética, isto é, menos de 1% de divergência do DNAm.

Segundo *Avise*, (1987) a explicação mais plausível para a distribuição dos haplótipos mitocondriais seria o fluxo gênico limitado entre populações em espécies que não foram subdivididas por barreiras zoogeográficas antigas. Desta forma, mutações recentes ficariam confinadas a determinadas áreas de ocorrência.

#### **5.4. Polimorfismo do DNAm<sub>t</sub> e sua implicação para o manejo dos estoques selvagens e cultivados da Pirapitinga-do-sul.**

A bacia do Paraíba do Sul possui uma longa história de degradação de seus recursos hídricos. Os diversos impactos, como atividades agropecuárias, desmatamento, portos de areia, construção de barragens entre outros, têm causado ao longo dos anos uma redução significativa dos estoques de peixes. Um exemplo disto, pode ser observado com outra espécie do gênero *Brycon*, a Piabanha (*Brycon insignis*). Esta espécie era considerada a segunda em volume de captura na bacia do Paraíba, com cerca de 23 ton/ano (Machado & Abreu, 1952), e que atualmente está seriamente ameaçada de extinção.

A diminuição drástica dos estoques de espécies de valor comercial têm sido uma realidade também para outras espécies em várias bacias hidrográficas brasileiras. Os diversos impactos causados pela intervenção humana, vem levando a uma redução da variabilidade intraespecífica, o que a longo prazo pode determinar uma não recuperação dos estoques. Desta forma, o manejo sustentável de uma espécie, que esteja sob pressão de captura ou mesmo em programas de repovoamento, requer a identificação e caracterização demográfica das populações na área de distribuição da espécie. A avaliação dos estoques genéticos [(GSA – Genetic Stock Assessment (Utter, 1991))] é a forma aplicável dos princípios e procedimentos da análise da estrutura genético populacional.

Os programas de repovoamento de peixes realizados pelas várias empresas de geração de energia elétrica no Brasil têm baseado suas atividades

no cumprimento das quotas de produção de alevinos, sem observar as questões relacionadas à manutenção da variação genética, sem a qual um programa de reintrodução pode ficar comprometido (Allendorf *et al.*, 1987).

A formação e manutenção de uma população em cativeiro deve ser guiada por princípios genéticos que permitam avaliar a distribuição da variação genética da espécie, e estabelecer o estoque fundador com uma única população genética ou pela combinação de várias populações (Vrijenhoek *et al.*, 1985; Stahl, 1987).

Os resultados apresentados pelo *RFLP* do DNAm<sub>t</sub> da Pirapitinga-do-sul mostraram que a manutenção de estoques em cativeiros possibilitou a conservação de linhagens haplotípicas não detectadas na natureza. Estas linhagens podem ser utilizadas como um marcador em peixes reintroduzidos, já que as fêmeas possuidoras destes haplótipos ao se reproduzirem com machos nativos perpetuam este haplótipo. Isto possibilita uma avaliação do sucesso reprodutivo e competitivo dos indivíduos reintroduzidos quando colocados em contato com as populações selvagens.

O DNAm<sub>t</sub>, por ser um genoma haplóide, sem recombinação e com um modo de herança uniparental, permite que, por meio de seu polimorfismo, uma possível subdivisão populacional possa ser caracterizada mais rapidamente, uma vez que o tamanho efetivo populacional para o genoma mitocondrial corresponde a um quarto do tamanho efetivo para o genoma nuclear (Birky *et al.*, 1989). Isto faz com que o DNAm<sub>t</sub> seja mais sensível aos fenômenos do

efeito gargalo e da deriva genética, e com isto apresente maiores níveis de diferenciação que marcadores nucleares (Crease *et al.*, 1990).

No presente estudo, apesar das populações apresentarem valores de divergência nucleotídica bem próximos, a distribuição geográfica da variação apresentou valores significativos entre populações, o que sugere uma estruturação populacional da espécie. Esta estruturação genética da Pirapitinga-do-sul, baseada no polimorfismo do DNAm, deve ser avaliada com certos cuidados. A ausência atual de fluxo gênico não significa necessariamente uma diferenciação dos conjuntos gênicos nucleares entre as populações. No entanto, embora as variações do DNAm apresentem provavelmente pouco valor adaptativo, a estruturação populacional evidenciada por este marcador pode ser um indicativo de uma possível adaptação local do genoma nuclear.

Meffe & Vrijeenhoek, (1988) recomendam que o manejo de populações nativas deve levar em consideração a estrutura populacional atual da espécie. Desta forma, a ausência de contato entre as populações, apresentada pela estrutura genético populacional da Pirapitinga-do-sul, enquadra estas populações ao chamado *Death Valley Model*. Por este modelo, em populações pequenas, que já não mantenham contato, precauções devem ser tomadas quanto ao manejo destas populações, que podem estar em processo de adaptação. Isto deve ser realizado com a manutenção de um tamanho efetivo populacional mínimo para se evitar os problemas causados pela perda de variabilidade genética.

No caso dos rios Buquira, que apresentou diversidade haplotípica nula, deve-se efetuar o repovoamento com haplótipos marcadores e acompanhar o comportamento reprodutivo dos indivíduos possuidores de tais haplótipos no transcorrer dos anos.

A situação atual do rio do Salto, onde foi constatado o desaparecimento das populações locais de Pirapitinga-do-sul, é um alerta para o que está ocorrendo com o rio Itagaçaba. Este rio, apesar de ainda apresentar uma reduzida população da Pirapitinga-do-sul, também está em processo de intensa deterioração ambiental, o que é um alerta quanto ao destino da ictiofauna local.

Não há evidências de existir uma pesca comercial sobre a Pirapitinga-do-sul, talvez devido à sua localização em rios de pequeno porte e à proibição de captura por redes nestes ambientes. Assim, verificou-se que a maior ameaça às populações desta espécie reside na constante destruição dos ambientes lacustres.

O presente estudo possibilitou o conhecimento da variabilidade genética da Pirapitinga-do-sul para uma avaliação futura das mudanças na estrutura genética das populações nativas e cultivadas, visando o manejo sustentado da espécie. A clonagem do DNAm<sub>t</sub> da Pirapitinga-do-sul permitirá também o estudo genético populacional e evolutivo de diversas outras espécies do gênero *Brycon* encontradas em diversas bacias hidrográficas no Brasil, muitas delas em processo de extinção.

## VI. CONCLUSÕES

1. O DNAm<sub>t</sub> da espécie apresentou um tamanho estimado de 16.300 ( $\pm$  500) pb;
2. Seis enzimas foram informativas entre as 24 utilizadas;
3. Foram detectados 27 haplótipos nas populações de Pirapitinga-do-sul avaliadas;
4. Heteroplasmia de sítio de restrição foi observado com a enzima *Nhe* I ;
5. A divergência média entre os 27 haplótipos foi de 0,825 %;
6. A diversidade haplotípica (*h*) média das populações selvagens foi de 0,62;

---

7. Os animais mantidos em cativeiro apresentaram um índice de diversidade haplotípica relativamente alto (*h*= 0,75), o que sugere a ausência de efeito fundador na formação do estoque reprodutor da Estação;

8. Os haplótipos 25 e 26 não foram encontrados nos estoques selvagens amostrados, o que permite utilizá-los como marcadores em futuros repovoamentos;
9. A composição haplotípica e os índices de divergência nucleotídica da Estação corrobora as informações sobre a origem do estoque fundador da Pirapitinga-do-sul;
10. As populações de Pirapitinga-do-sul apresentaram-se estruturada de acordo com a análise de variância (AMOVA);
11. A disposição geográfica dos rios amostrados, aliada aos dados de divergência nucleotídica e a evidência de estruturação genética, sugere que a Pirapitinga-do-sul esteja enquadrada na Categoria III proposta por *Avise et al.*, 1987;
12. A presença dos haplótipos heteroplásmicos nos rios Negro e do Peixe mostrou que os alevinos introduzidos adaptaram-se e estão reproduzindo-se nestes ambientes;
13. O manejo das populações selvagens deve levar em consideração a atual estrutura populacional da espécie;

## VI. RESUMO

A diversidade do DNA mitocondrial pelo *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi usada para investigar a estrutura genético populacional, e avaliar o potencial desta metodologia para identificação e manejo das populações cultivadas e selvagens da Pirapitinga-do-sul - *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) na bacia do Paraíba-do-sul.

Amostras de DNA de 283 indivíduos, provenientes de 7 rios da bacia do Paraíba-do-sul e da Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna (CESP), foram analisadas pela hibridação com sondas mitocondriais homólogas. De um total de 24 enzimas de restrição, 6 foram selecionadas (*Apa* I, *Ava* II, *EcoR* I, *Hinc* II, *Hpa* I, *Nhe* I) por produzirem polimorfismo, as quais resultaram em 27 haplótipos mitocondriais.

O DNA mitocondrial da espécie em estudo apresentou um tamanho de 16,300 ( $\pm 500$ ) pb. Heteroplasmia de tamanho da molécula não foi observada, porém, em 17.5% dos animais da Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna (CESP), 2.7% do rio Negro e 15.79% do rio do Peixe o fenômeno da heteroplasmia de sítio de restrição com a enzima *Nhe* I foi observado.

Dois haplótipos (25 e 26) foram encontrados exclusivamente nos indivíduos da Estação. Desta forma, em razão da transmissão materna do DNA mitocondrial esses dois haplótipos podem ser considerados como marcadores

potenciais para avaliar a sobrevivência e sucesso reprodutivo de peixes introduzidos em projetos de repovoamento.

A diversidade haplotípica dos animais mantidos em cativeiro foi relativamente alta ( $h=0.75$ ), e a das populações selvagens foi de  $h=0.62$ . A diversidade nucleotídica média entre os 27 haplótipos encontrados para o *Brycon opalinus* foi de 0.825%. A análise da variância molecular (AMOVA – *Analysis of MOlecular VAriance*) apresentou maior percentagem de variância nucleotídica dentro das populações (70.02%). Contudo, 15.97% da variância foi observada entre populações. Estes índices possibilitaram avaliar a condição atual do estoque de reprodutores mantidos em cativeiro, e utilizado na produção de alevinos para o repovoamento. Em conjunto, estes dados permitiram analisar a estruturação genética da espécie na natureza, seus aspectos evolutivos, e a relação entre conservação dos ambientes lacustres e variabilidade genética mitocondrial das populações selvagens.

## VIII. ABSTRACT

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis of mitochondrial DNA was carried out to investigate the population genetic structure and its potential as a tool to identify and manage the cultured and wild populations of Pirapitinga-do-sul – *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) in the Paraíba do sul watershed.

DNA samples from 283 fish, collected in 7 rivers of Paraíba watershed and in the Hydrobiology and Aquaculture Station of Paraibuna (CESP), were analysed. 24 restriction enzymes were screened and 6 (*Apa* I, *Ava* II, *EcoR* I, *Hinc* II, *Hpa* I, *Nhe* I) of them which produced multiple cutting sites in the molecule were selected. The combination of the 6 informative enzymes revealed 27 haplotypes.

The mtDNA of Pirapitinga-do-sul had 16.300 ( $\pm 500$ ) bp long. No length heteroplasmy was found but restriction site heteroplasmy was observed in 17.5% of the fish from the Hydrobiology and Aquaculture Station of Paraibuna (CESP), as well as in 2.7% of the samples from Negro River, and 15.7% from Peixe River.

Two haplotypes (25 and 26) were found exclusively in the hatchery facilities. Such haplotypes can provide information on both the survival and long-term reproductive success of stocked fish.

Haplotype diversities were high both in the population from the Aquaculture Station ( $h=0.75$ ), and from the wild ( $h=0.62$ ). Nucleotide diversity

among the 27 haplotypes found for the *Brycon opalinus* was 0.825%. The molecular variance analysis (AMOVA - "Analysis of MOlecular VAriance") showed that the largest percentage of variance was observed within populations (70,02%). However, 15,97% of the total diversity were explained by interpopulation variance. Computer simulations of mtDNA variability indices were used to appraise the present situation of broodstock kept in captivity for stocking purposes. Also, genetic structure of natural populations, its evolution aspects and the relationship between conservation of riverine habitats and mitochondrial genetic variability of wild populations were discussed.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Saber, A.N., 1957. O problema das conexões antigas e da separação da drenagem do Paraíba e do Tiête. **Boim. Paul. Geogr.** **26**: 38-49.
- Allan, J.D., Flecker, A.S., 1993. Biodiversity conservation in running waters: Identifying the major factors that threaten destruction of riverine species and ecosystems. **BioScience** **43**: 32-43.
- Allendorf, F.W., Ryman, N., Utter, F., 1987. Genetics and fisheries management: past, present, and future. *In*: **Population Genetics and Fisheries Management**, Ryman, N., Utter, F., (eds), University of Washington Press, Seattle, pp. 1-20.
- Alm, A., 1991. Washington watch: New directions for EPA. **BioScience** **41**: 451.
- Almeida, F. F., 1964. Fundamentos geológicos do relevo paulista. **Boletim do Instituto Geográfico e Geológico (SP)** **41**: 169-263.
- Almeida, F. F., 1971. As bacias sedimentares brasileiras e a Paleontologia. **Anais Acad. Brasil. Ciênc.** **43(supl.)**: 9-18.
- Almeida-Toledo, L. F., Bigoni, A. P., Bernadino, G; Foresti, F., Toledo-Filho, S.A., 1996. Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical *Bryconids*. **Caryologia**. **49**: 35-43.

Almeida-Val, V.M.F., 1986. Lactato desidrogenase de duas espécies de peixes da Amazônia: *Mylossoma duriventris* e *Colossoa macropomum* (Characiformes). Aspectos adaptativos. **Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação, Universidade do Amazonas.**

Almeida-Val, V.M.F., Luis-Val, A., 1990. Adaptação bioquímica em peixes da Amazônia. **Ciência Hoje 11: 62-67.**

Alvarenga, H.M.F., 1982. Uma gigantesca ave fóssil do cenozóica brasileiro: *Physornis brasiliensis* sp. **Anais Acad. Brasil. Ciênc. 54: 697-712.**

Antunes, S.A., 1994. Tecnologia pós-colheita do Matrinchã, *Brycon cephalus*, criado no CEPALBAMA: Situação atual dos estudos da composição dos filés, das carnes clara e escura e do preparo. **Anais do I Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero Brycon**, Pirassununga, 49-52.

Aquadro, C.F., Greenberg, B.D., 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. **Genetics 103: 287-312.**

Attardi, G., 1985. Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. **Int. Rev. Cyt. 93: 93-145.**

Avise, J.C., Lansman, R.A., 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals, *In: Evolution of genes and proteins*. Nei, M., Koehn (eds), Sinauer, Sunderland, MA: 147-164.

- Avise, J.C., 1985. Identification and interpretation of mitochondrial DNA stocks in marine species. *In: Proceedings of the stock identification workshop:* pp. 107-136.
- Avise, J.C., Vrijenhoek, R.C., 1987. Mode of inheritance and variation of mitochondrial DNA in hybridogenetic fishes of the genus *Poeciliopsis*. **Mol. Biol. Evol.** 4: 514-525.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, M.R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 18: 489-522.
- Avise, J.C., 1994. **Molecular markers, natural history and evolution.** Chapman & Hall, 551 p.
- Barker, J.R. & Tingey, D.T., 1992. **Air pollution effects on biodiversity.** Van Nostrand Reinhold, New York.
- Barrow, C., 1988. The impact of hydroelectric development on the Amazonian environment: with particular reference to the Tucuruí Project. **Journal of Biogeography** 15: 67-78.
- Beattie, M., 1994. **Action plan for fishery resources and aquatic ecosystem.** US Department of the Interior, US Fish & Wildlife Service, Washington, DC, 16 pp.
- Beckwitt, R., Petruska, J., 1985. Variation in mitochondrial DNA genome size among fishes of the family Scorpanidae. **Copeia** : 1056- 1058

- Bentzen, P., Leggett, W.C., Brown, G.G., 1988. Length an restriction site heteroplasmy in the mitochondrial DNA of American shad (*Alosa sapidissima*). **Genetics** **118**: 509-518.
- Bentzen, P., Leggett, W.C., Brown, G.G., 1988. Mitochondrial DNA polymorphism, population structure, and life history variation in American shad (*Alosa sapidissima*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** **46**: 1466-1454.
- Bermingham, E., Lamb, T., Avise, J.C., 1986. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. **J. Hered.** **77**: 249-252.
- Bernatchez, L., Dondson, J.J., Boivin, S., 1989. Population bottlenecks: influence on mitochondrial DNA diversity and its effect in Coregonine stock discrimination. **Journal of Fish Biology** **35(Suppl. A)**: 233-244.
- Bernatchez, L., Dodson, J.J., 1990. Allopatric origin of sympatric populations of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis. **Evolution** **44**: 1263 –1271.
- Bielawski, J.P., Pumo, D.E., 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. **Heredity** **78**: 32-40.
- Billington, N., Hebert, P.D.N., 1990. Technique for determining mitochondrial DNA markers in blood samples from Walleyes. **American Fisheries Society Symposium** **7**: 492-498.
- Billington, N., Hebert, D.N., 1988. Mitochondrial DNA variation in great lakes Walleye (*Stizostedion vitreum*) populations. **Can. J. of Fish. Aquat. Sci.** **45**: 643-654.

- Billington, N., Barrette, R.J., Hebert, P.D.N., 1992. Management implications of mitochondrial DNA variation in Walleye stocks. **North American Journal of Fisheries Management** 12: 276-284.
- Billington, N., Hebert, D.N., 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Can J. Fish. Aquat. Sci.** 48(Suppl. 1): 80-94.
- Billington, N., Maceina, M.J., 1997. Genetic and population characteristics of Walleyes in the mobile drainage of Alabama. **Transactions of the American Fisheries Society** 126: 804-814.
- Billington, N., Hebert, P. D. N., 1990. Technique for determining mitochondrial DNA markers in blood samples from Walleyes. **American Fisheries Society Symposium** 7: 492-498.
- Birky, C.W., Fuerst, P., Maruyama, T., 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. **Genetics** 121: 613-627
- Birky, C.W., Maruyama, T., Fuerst, P., 1983. An approach to populations theory for genes in mitochondria and chloroplast, and some results. **Genetics** 103: 513-527.
- Bittencourt, M.M., Cox-Fernandes, C., 1990. Peixes migradores sustentam pesca comercial. **Ciência Hoje** 11: 20-24.
- Bodaly, R.A., Hecky, R.E., Fudge, R.J.P., 1984. Increases in fish mercury levels in lakes flooded by the Churchill river diversion, northern Manitoba. **Can J. Fish. Aquat. Sci** 41: 682-691.

Bonetto, A.A., 1980. Problemas relativos a la producción pesquera en los lagos de represas. **Corrientes** 9: 1-21.

Bonga, S.E.W., 1997. The stress response in fish. **Physiological Reviews** 77: 591-625.

Bowen, B.W., Avise, J.C., 1990. Genetic structure of atlantic and gulf of Mexico populations of sea bass, Menhaden, and sturgeon: influence of zoogeographic factors and life history patterns. **Mar. Biol.** 107: 371-381.

Branch, W.R., 1994. Let their song be heard. Frogs – jewels of the wetlands, Africa. **Environment & Wild Life** 2: 40-47.

Britski, H.A., Sato, Y., Rosa, A.B.S., 1994. A fauna de peixes brasileiros de água doce e o represamento de rios. *In*: COMASE. **Seminário sobre fauna aquática e o setor elétrico brasileiro; reuniões temáticas preparatórias. Foz de Iguaçu, Caderno 1: Fundamentos.** Rio de Janeiro: Eletrobrás, 1994. p. 23-30.

Braum, E., Junk, W. J., 1982. Morphological adaptation of two Amazonian Characoids (Pisces) for surviving in oxigen deficient waters. **Rev. Ges. Hydrobiol.** 67: 869-886.

Brown, K.S., Ab'Saber, A.N., 1979. Ice-age forest refuges and evolution in the neo-tropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with modern biological endemism. **Paleoclimas (São Paulo) No. 5.**

Brown, G.C., Simpson, M.V., 1982. Novel features of animals mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. **Proc. Natl. Acad. Sci USA 79**: 3246-3250.

Brown, J.R., Beckenbach, A.T., Smith, M.J., 1992. Mitochondrial length variation and heterolasmly in population of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **Genetics 132**: 221-228.

Brown, W.M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA, *In: Evolution of genes and proteins*, Nei, M., Koehn (eds), Sinauer, Sunderland, MA: 62-88.

Brown, W.M., 1985. **The mitochondrial genome of animals**. In: Evolutionary genetics, MacIntyre, R.J. (ed), Plenum, New York: 95-130.

Brown, W.M., George, M. Jr & Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci USA 76**:1967-1971.

Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., Wilson, A.C., 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. **J. Mol. Evol. 18**: 225-239.

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

Buroker, N.E., Brown, J.R., Gilbert, T.A., O'Hara, P.J., Beckenbach, A.T., Thomas, W.S., 1990. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. **Genetics 124**: 157-163.

- Calcagnotto, D., 1998. Caracterização dos bancos genéticos selvagens de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) através da análise do DNA mitocondrial. **Tese de Doutorado, USP**, São Paulo, 131 p.
- Caramaschi, E.P., 1991. **Levantamento da ictiofauna do Rio Paraíba do sul e ciclo reprodutivo das principais espécies, no trecho compreendido entre Três Rios e Campos**. UFRJ, Furnas Centrais Elétricas S.A, ENGEVIX, 273 p.
- CESP. Aspectos limnológicos, ictiológicos e pesqueiros de reservatórios da CESP no período de 1986 a 1994. **Série Pesquisa e Desenvolvimento-136: 78 p.**
- CESP. **Relatório de levantamento ictiológico e limnológico na represa de Paraibuna e Promissão**, 1982. 9p. (Relatório interno).
- Chakraborty, R., Leimar, O., 1987. Genetic variation within a subdivided population. *In: Population genetics and fishery management*. University of Washington Press, Seattle: 89-120
- Chang, Y-S., Huang, F-L. & Lo, T-B., 1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. **J. Mol. Evol.** **38**: 138-155.
- Chapman, R. W., Stephens, J.C., Lansman, R.A., Avise, J.C., 1982. Models of mitochondrial DNA transmission genetics and evolution in higher eucaryotes. **Genetics Res.** **40**: 41-57.

- Chapman, R. W., Powers, D. A., 1984. A method for the rapid isolation of mitochondrial DNA from fishes. **Tech. Repo. No. UM-84-05** Maryland Sea Grant Program College Park MD.
- Chapman, R.W., 1987. Changes in the population structure of male Striped bass, *Morone saxatilis*, spawning in the three areas of the Chesapeake bay from 1984 to 1986. **Fish. Bull. 85**: 167-170.
- Clayton, D.A., 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. **Annu. Rev. Cell. Biol. 7**: 453-78
- Cohen, J. P., 1990. Genetics for wildlife conservation. **Bioscience 40**: 167-171.
- Coughland, J.P., Imsland, A.K., Galvin, P.T., Fitzgerald, R.D., Naevdal, G, Cross, T.F., 1998. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. **Journal of Fish Biology 52**: 916-922.
- Crease, T.J., Lynch, M., Spitze, K., 1990. Hierarchical analysis of population genetic variation in mitochondrial and nuclear genes in *Daphnia pulex*. **Molecular Biology and Evolution 7**: 444-458.
- ~~Cushman, R.M., 1985. Review of ecological effects of rapidly varying flows downstream from hydroelectric facilities. **North American Journal of Fisheries Management 5**: 330-339.~~
- Cuvier, M.G., 1819. Sur les poissons du sous-genre hydrocyn, sur deux nouvelle espèces de *Chalceus*, sur trois nouvelle espèces de *Serrasalmes*, et sur l'*Argentina glossodonta* de Forskahl, qui est l'*Aubula gonorhynchus* de Bloch. **Mem. Mus. Hist. Nat. Paris 5**: 351-379 – Prs 26-28.

Daley, W.J., The use of fish hatcheries: polarizing the issue. **Fisheries** 3: 4-5.

Danzmann, R.G., Ihssen, P.E., Herbert, P.D.N., 1991. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook char, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. **Journal of Fish Biology** 39 (Supplement A): 69-77.

Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., Arndt, S.K.A., 1993. Mitochondrial DNA variability in Ontario and New York rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Canadian Journal of Zoology** 71: 1923-1233.

Deffontaines, P., 1945. O Paraíba, estudo de rio no Brasil. **Bolm. Paul. Geogr.** 3(30): 830-835.

Delarbre, C, Spruyt, N., Delmarre, C, Gallut, C., Barriel, V., Janvier, P., Laudet, V. Gachelin, G., 1998. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the Dogfish, *Scyliorhinus canicula*. **Genetics** 150: 331-344.

Desjardins, P., Morais, R., 1991. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome, **J. Mol. Biol.** 212: 599-634.

Dizon, A.E., Lockyer, C., Perrin, W.F., Demaster, D.P., Sisson, J., 1992. Rethinking the stock concept: a phylogeographic approach. **Conservation Biology** 6: 24-36.

Dowling, T.E., Minckley, W.I., Marsh, P.C., Goldstein, E.S., 1996. **Conservation Biology** 10: 120-127.

Duarte, L., Jupiassu, A.M.S., 1971. Vegetais meso e cenozóicos do Brasil. **Anais Acad. Brasil. Ciênc.** **43(supl.):** 433-443.

Ehrlich, P., Ehrlich, A., 1992. The value of biodiversity. **Ambio** **21(3):** 219-226.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** **131:** 479-491.

FAO Fisheries Statistics, 1997. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome.

FAO, 1998. **Future of fish food depends on better management of oceans**, Press Releases, no. 32.

Faria, C.A., 1994. Propagação artificial de Paiabanha (*Brycon insignis*) na Seção de hidrobiologia e Aqüicultura de Paraibuna – CESP. **Anais do I Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero Brycon**, Pirassununga, 9-15.

Fauron, C.M-R, Wolstenholme, D.R., 1980. Intraspecific diversity of nucleotide sequences within the adenine + thymine-rich region of mitochondrial DNA molecules of *Drosophila mauritiana*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*. **Nucleic Acids Res.** **8:** 5391-5410.

Fearnside, P.M., 1990. Balbina: lições trágicas da Amazônia. **Ciência Hoje** **11(64):** 34-42.

Ferguson, M.M., Bernatchez, I., Gatt, M., Konkle, B.R., Lee, s., Malott, M.L., McKinley, R.S., 1993. Distribution of mitochondrial DNA variation in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the Moose river basin, Ontario, Canada. **Journal of Fish Biology**. **43 (Supplement A)**: 91-101.

Ferguson, M.M., Ihssen, P.E., Hynes, J.D., 1991. Are cultured stocks of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) genetically similar to their source populations. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** **48 (suppl. 1)**: 118-123.

Ferreira, E J G; Zuanon, J & Santos, G M, 1996. A list of commercial fish species from Santarém, State of Pará, Brazil. **NAGA - The ICLARM Quartely**, July: 41-44.

Ferris, D.S., Berg, W.J., 1987. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. *In*: **Population Genetics & Fisheries Managements**, Ryman, N & Utter, F (eds), pp. 277-299.

Fowler, H.W., 1951. Os peixes de água doce do Brasil (4ª entrega). **Arq. Zool. São Paulo** **6**: 1-625.

Fowler, H.W., 1954. Os peixes de água doce do Brasil (4ª entrega). **Arq. Zool. São Paulo** **6**: 1-400.

Franck, J.P.C., Harris, A. S., Bentzen, P., Denovan-Wright, E.M., Wright, J.M., 1991. Organization and evolution of satellites, minisatellites and microsatellites DNAs in teleosts fishes. *In*: **Oxford Surveys on Eukaryotic Genes**, Maclean, N., ed., Vol. 7. Oxford: Oxford Univ. Press, pp. 31- 82.

Gentilli, J., 1949. Foundation of Australian bird geography. **Emu** **49**: 85-130.

Gery, J., 1978. **Characoids of the world**. TFH Publ. Inc., Neptune N.J., 672 p.

Géry, J., Mahnerdt, V, 1992. Notes sur quelques *Brycon* des bassins de l'Amazonie, du Parana-Paraguay et du sud-est brésilien (Pisces, Characiformes, Characidae). **Reveu Suisse Zool.** **99(4)**:793-819.

Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., Wallace, D.C., 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **77**: 6715-6719.

Girardi, L., Santos, P.P., Faria, C.A., 1995. Repovoamento com *Brycon* cf. Reinhardt (Pirapitinga-do-sul) em tributários do reservatório da UHE Paraibuna/Paraitinga, CESP, São Paulo. *In*: **Encontro Brasileiro de Ictiologia XI**. Resumos. Campinas, ICI. PUCCAMP: 14.

Gjedrem, T., 1992. Breeding plans for rainbow trout. **Aquaculture** **100**: 1-10.

Godoy, M.P., 1975. **Peixes do Brasil – subordem characoidei. Bacia do rio Mogi-Guaçu - Piracicaba**, Franciscana. V. 1 e 4.

Goulding, M, 1980. **The fishes and the forest in Amazon natural history**. Univ. of California Press, Berkeley, CA, 280 pp.

Grant, W.S., Teel, D.J., Kobayashi, T., 1984. Biochemical population genetics of Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) comparison with Atlantic halibut (*H. hippoglossus*) **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** **41**: 1083-8

Gray, M.V., 1992. The endosymbiont hypothesis revisited, **Int. Rev. Cytol.** **141**: 233-357.

- Greenwood, P. H., 1984. African cichlids and evolutionary theories. *In: Evolution of fish species flocks*, Echelle, A. A., Kornfield, I. (eds).. Univ. Maine Press, Orono: pp. 141-154.
- Greenberg, B.D., Newbold, J.E., Sugino, A. 1983. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. **Gene 21**: 33-49.
- Grewe, P.M., Hebert, P.D.N., 1988. Mitochondrial DNA diversity among broodstocks of the lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Can. J. of Fish. Aquat. Sci. 45**: 2114-2122.
- Grodzicker, T; Williams, J.; Sharp, P. & Sambrook, J., 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 39: 439-446.
- Groombridge, B. (ed), 1993, 1994 **IUCN Red List of Threatened animals**, IUCN, Gland. 286 pp.
- Guimarães, F.M.S., 1943. O Vale do Paraíba. **Bolm. Paul. Geogr.** 1(4): 35-36.
- Guerrant, E.O.Jr., 1996. Designing populations demographic, genetic, and horticultural dimensions. *In: Falk, D.A., Millar, C.I., & Olwell, M., (eds). Restoring diversity: strategies for reintroduction of rare plants.* IslandPress, Washington, D.C., pp. 171-207.
- Gulland, J.A., 1969. Manual of methods of fish stock assessment. Part I. Fish Population Analysis. **FAO Man. Fish. Sci.** 4: 154 p.

Gup, T., 1994. Dammed from here to eternity: dams and biological integrity. **Trout 35**: 14-20.

Gyllensten, U.B., 1985. The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. **Journal of Fish Biology 26**: 691-699.

Gyllensten, U.B., Wilson, A.C., 1987. Mitochondrial DNA of salmonids. *In*: **Population Genetics and Fisheries Management**, Ryman, N., Utter, F., (eds), University of Washington Press, Seattle, pp. 301-307.

Gyllensten, U.B., Wharton, D., Jossefsson, A., Wilson, A.C., 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. **Nature 352**: 255-257.

Hansen, M.M., Mensberg, K. D., Rasmussen, G., Simonsen, V., 1997. Genetic variation within and among Danish brown trout (*Salmo trutta* L.) hatchery strains, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments., **Aquaculture 153**: 15-29.

Hayashi, J-I, Tagashira, Y & Yoshida, M.C., 1985. Absence of extensive recombination between inter- and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. **Exp. Cell Res. 160**: 387-395.

Heilst, E.J., Musick, J.A., Graves, J.E., 1996. Genetic population structure of the Shortfin Mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. **Can J. Fish. Aquat. Sci. 53**: 583-588.

- Hildebrand, S G, Bell, M C, Richey, E P, Anderson, J.J., Parkhurst, 1980. Analysis of environmental issues related to small-scale hydroelectric development II: Design and consideration for passing fish upstream around dams. **ORNT/TM-736**, Environmental Services Division, OAK Ridge National Laboratory, 78 p.
- Hilsdorf, A., Caneppele, D., Krieger, J.E., 1999. Muscle Biopsy Technique for Electrophoresis Analysis of Fish of the Genus *Brycon*. **Genetics and Molecular Biology 22**: (no prelo).
- Hoeh, W.R., Blakley, K.H., Brown, W.N., 1991. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA **Science 251**: 1488-1490.
- Hopkin, K., 1999. Death to sperm mitochondria. **Scientific American 280**: 12.
- Howes, G, 1982. Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). **Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool) 43(1)**:1-47.
- Ihssen, P.E., Booje, H.E., Casselman, J.M., Mcglade, J.M., Payne, N.R., Utter, F.M., 1981. Stock identification: materials and methods. **Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38**: 1838-1855
- Iwama, G.K., McGeer, J.C & Bernier, N.J. 1992. The effects of stock and rearing history on the stress response in juveline coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **ICES. J. Mar. Sci. Symp. 194**: 67-83
- Johansen, S, Guddal, P.H., Johansen, T, 1990. Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Nucleic Acids Res. 18**: 411-419.

Kieser T (1984). DNAGEL: a computer program for determining DNA fragment sizes using a small computer equipped with a graphics tablet. **Nucleic Acids Research** 12: 679-688.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwrds, S.V., Pääbo, S., Villabanca, F.X., Wilson, A.C, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 86: 6196-6200.

Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E.T., Ishiwa, H., Takahata, N., Chigusa, S.I., 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. **Genetics** 126: 657-663

Kuntson, I., Stonner (ed.). 1989. **Biotic diversity and germplasm preservation, global imperatives**. Kluwer Academic, Dordrecht. 530 p.

Lee, W-J, Conroy, J, Howell, H.H., Kocher, T.D., 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. **J. Mol. Evol.** 41: 54-66.

Lee, K.N., 1989. The Columbia river basin: experimenting with sustainability. **Environment** 31: 6-11, 30-33.

~~Lee, W-J. & Kocher, T.D., 1995. Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization. **Genetics** 139: 873-887.~~

Lelek, A., 1984. Ecological aspects of the damming of river in Borneo. **Appl. Geogr. and Development** 24: 60-73.

Ligon, F. K., Dietrich, W.E., Trush, W.J., 1995. Downstream ecological effects of Dams – A geomorphic perspective. **BioScience** 45(3): 183-192.

Lima, R.S., 1997. Ictiofauna do alto curso do rio Paraíba do Sul. **Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências-USP**, 221 p.

Long, R.G., 1953. O vale do médio Paraíba. **Rev. Brasil. Geogr.** **15(3)**: 385-476.

Luetken, C.R., 1874. Characinae novae Brasiliae centralis. Overs. K. danske **Widensk. Selsk. Forho.** **1873(3)**: 127-143.

Lu, G., Li, S., Bernatchez, L., 1997. Mitochondrial DNA diversity, population structure, and conservation genetics of four native carps within the Yangtze River, China. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** **54**: 47-58.

Luo, H., Coppenolle, B.V., Seguin, M., Boutry, M., 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and phylogenetic relationship in *Hevea brasiliensis*. **Molecular Breeding** **1**: 51-63.

Machado, C.E. de M., 1975. **Grandes barragens e meio ambiente; dois aspectos importantes.** São Paulo, CESP, 50 p.

Machado, C.E., Abreu, H. C. F., 1952. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no estado de São Paulo - I, A Pesca no Vale do Paraíba. **Boletim de Industria Animal** **13**:145-160.

Margarido, V. P., Galetti Jr, P. M., 1996. Chromosomes studies in fish of the genus *Brycon* (characiformes, Characidae, Bryconinae). **Cytobios** **85**: 219-228.

Margulis, L., 1970. **The Origin of Eukaryotic Cells.** Yale University Press.

Mattos, J.A., Homem, M.C.J., Catherino, R.P., 1997. **A CESP, o meio ambiente e o seu negócio**. CESP, 39 p.

May, B., Krueger, C.C., 1990. **Use of allozyme for population analysis**. In: **Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management**. Whitmore, D.H. (ed): pp 157-171.

McDonald, D.G., Waller, C.L., 1993. Physiological responses of lake trout to stress effects of water hardness and genotype. **Trans. Am. Fish. Soc.** **122**: 1146-1155.

McElroy, D., Moran, P., Bermingham, E., Kornfiel, I., 1992. REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. **Journal of Heredity** **83**: 157-158.

Meffe, G.K., Vrijenhoek, R.C., 1988. Conservation genetics in the management of desert fishes. **Conservation Biology** **2**: 157-169.

Mendonça, O.J.J., 1994. Criação de espécies do gênero Brycon no CEPTA/IBAMA. **Anais do I Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero Brycon**, Pirassununga: 31-48.

Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fish, *In*: **Biochemistry and Molecular Biology of Fish**, Vol 2 Hochachka P.W. & Mommsen, P. (eds) Elsevier Press, pp. 1-38.

Meyer, A, 1994. DNA technology and phylogeny of fish. *In*: Beaumont, A.R. (ed) **Evolution of aquatic organisms**, Chapman & Hall: pp. 219-249.

- Moyle, P.B., Leidy, R.A., 1992. Loss of biodiversity in aquatic ecosystems: evidence from fish faunas. *In: Conservation Biology: The theory and practice of nature conservation, preservation, and management.* Fielder, P.L., Jain, S.K. (eds). Chapman and Hall, New York. Pp. 127-169.
- Moritz, C., 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. **Molecular Ecology** 3: 401-411.
- Mueller, J., Troschel, F.H., 1844. Synopsis generum at specierum familiae Characinarum (Prodromus descriptionis novorum generum et specierum). **Archiv. Naturgesch.** 10(1): 81-99.
- Murata, S., Takasabi, N., Okada, N., 1993. Determination of the phylogenetic relationship among Pacific salmonids by using interspersed elements (SINEs) as a temporal landmarks of evolution. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA** 90: 6995-6999.
- Murdoch, M.H., Hebert, P.D.N., 1994. Mitochondrial DNA diversity of Brown bullhead from contaminated and relatively pristine sites in the great lakes. **Environmental Toxicology and Chemistry** (13): 1281-1289.
- Narahara, M. T., 1994. Pesquisas sobre a criação de espécies do gênero *Brycon* no Instituto de Pesca, **Anais do I Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero *Brycon***, Pirassununga, 5-8.
- Nei, M., Tajima, F., 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonuclease genetics. **Genetics** 97: 145-163.
- Nei, M., 1987. DNA polymorphism within and between populations. *In: Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University press. Pp 254-286.

Nei, M., Muller, J.C., 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. **Genetics** **125**: 873-879.

Nelson, J.S., 1994. **Fishes of the world**, 3<sup>a</sup> ed. Wiley, New York., 600 pp.

Noack, K., Zardoya, R., Meyer, A., 1996. The complete mitochondrial DNA sequence of the bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a basal ray-finned fish: ancient establishment of the consensus vertebrates gene order. **Genetics** **144**: 1165-1180.

Orti, G., 1995. The evolutionary radiation of Characiform: a molecular phylogenetic perspective. **PhD Thesis - State University of New York at Stony Brook**.

Pääbo, S., Thomas, W.K., Whitfield, K.M., Whitfield, K.M., Kumazawa, Y., Wilson, A. C., 1991. Rearrangements of mitochondrial transfer RNA genes in marsupials. **J. Mol. Evol.** **33**: 426-430.

Paiva, M.J.T.R., 1991. Características sanguíneas da Pirapitinga-do-sul, *Brycon* sp., sob condições experimentais de criação intensiva. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** **28(2)**: 141-153.

Pereira Filho, M., 1994. Estudos desenvolvidos no INPA (Manaus-amazonas) com o Matrinchã, *Brycon cephalus*. **Anais do I Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero Brycon**, Pirassununga, 25-30.

- Pitman, W. C. I., Cande, S., Labrecque, J., Pindell, J., 1993. **Fragmentation of Gondwana: Separation of Africa from South America. In: Biological relationships between Africa and South America.** Goldblatt, P (ed). Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut: pp. 15-34.
- Powell, J.R., 1997. Molecular Evolution. *In: Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model.* Oxford University Press: pp. 381-395.
- Reimer, G, 1982. The influence of diets on the digestive enzymes of the Amazon fish Matrinchã, Brycon cf. melanopterus. **Journal of Fish Biology**, **27**:637-642.
- Renno, J –F., Berrebi, P., Boujard, T., Guyomard, R., 1990. Intraspecific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and Brazil: a genetic approach to the refuge theory. **Journal of Fish Biology** **36**: 85-95.
- Revaldaves, E, Renesto, E., Machado, M.F.P.S., 1997. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics** **20**: 381-388.
- Richter, B.D., Braun, D.P., Mendelson, M.A., Master, L.L., 1997. Threats to imperiled freshwater fauna. **Conservation Biology** **11**: 1081-1093.
- Rinne, J.N., Johnson, J.E., Jensen, B.L., Ruger, A.W., Sorenson, R., 1986. The role of hatcheries in the management and recovery of threatened and endangered fishes. *In: Fish culture in fisheries management.* **American Fisheries Society** , Stroud, R. (ed ), Bethesda, Maryland: pp. 271-285.

Rudd, W.M., Harris R., Kelly, C.A., Hecky, R.E., 1993. Are Hydroelectric reservoirs significant sources of greenhouse gases ?. **Ambio** **22**: 246-248.

Ryman, N., Utter, F., 1987. **Population genetics and fishery management**. Univ. Washington Press, Seattle,

Ryman, N., 1991. Conservation genetics considerations in fishery management. **Journal of Fish Biology** **39(Suppl. A)**: 211-224

Schneider, S., Kueffer, J-M., Roessli, D., Excoffier, L., 1997. **ARLEQUIN ver. 1.1: A software for population genetic analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Sick, K., 1961. Haemoglobin polymorphism in fishes. **Nature** **192**: 894-896.

Silva, J.F.G., Santana, M.C., Campos, V.S., 1997. **CESP e a responsabilidade sócio-ambiental**, Programa de Especialização/Gestão de Negócio de Energia Elétrica. Monografia: 29 p.

Smith, P.J., Jamieson, A., Birley, A.J., 1990. Electrophoretic studies and stock concept in marine teleosts. **J. Cons. Int. Explor. Mer** **47**: 231-245

Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973. **Numerical Taxonomy**. Freeman, W.H. Co., San Francisco.

Southern, E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. **J. Mol. Biol.** **98**: 503-517.

- Stahl, G., Genetic population structure of atlantic salmon. *In: Population Genetics and Fisheries Management*, Ryman, N., Utter, F., (eds), University of Washington Press, Seattle: pp. 121-140.
- Steindachner, F., 1876. Die Süßwasserfische des südöstlichen Brasilien III. Sitzber. K. Akad. Wiss. Wien **74**: 559-694, pl. 1-13
- Stoneking, M., Hedgecock D., Higuchi R.G., Vigilant, L., Erlich, H.A., 1991. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am. J. Human Genet.* **48**: 370-382.
- Sutherland, B. Stewart, D, Kenchington, E.R., Zouros, E., 1998. The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics* **148**: 341-348.
- Szekely, F., 1982. Ecological aspects of large hydroelectric projects on tropical countries. *Water Supply and Management* **6**: 233-242.
- Tabata, K., Mizuta, A., 1997. RFLP analysis of the mtDNA D-loop region in Red Sea Bream (*Pagrus major*) populations from four location of western Japan. *Fisheries Science* **63**: 211-217.
- Taggart, J. B., Hynes, R. A., Prodohl, P. A. Fergusson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology* **40**: 963-965.

Templeton, A.R., 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the humans and apes. **Evolution** 37: 221-224.

Toledo-Filho, S. A., Almeida-Toledo, L. F., Foresti F., Galhardo, E., Donola, E., 1992. Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. **Cadernos de Ictiologia - 1**, 39 p.

Toledo-Filho, S. A. 1994. Resenha de trabalhos sobre genética do gênero *Brycon*. **Anais do I Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero Brycon**, Pirassununga: pp.19-20.

Torloni, C.E.C., Girardi, L., Nascimento, E.P., 1986. Considerações sobre a utilização de escada para peixes e estações de aquicultura na conservação da fauna ictífica no Estado de São Paulo. **Coleções Ecossistemas Aquáticos - 003**, CESP, 20. ed., 8 p.

Torloni, C.E.C., Moreira, J.A., Guimarães, J.R., Girardi, L., Cruz, J.A., Costa, J., 1986. **Reprodução de peixes autóctones reofílicos no reservatório de Promissão**, Estado de São Paulo, Brasil, São Paulo, CESP, 13 p.

Travassos, H., Santos, S.r., 1955. Caracídeos fósseis da bacia do Paraíba. **Anais Acad. Bras. Ciên.** 27(3): 297-322.

Tzeng, C.S., Hui C.F., Shen, S.C. & Huang, P.C., 1992. The complete sequence of the *Crossostoma lacustre* mitochondrial genome: conservation and variations among vertebrates. **Nucleic Acids Res.** 20: 4853-8.

Tundisi, J.G., 1986. Represas e Barragens. **Ciência Hoje** 5: 49-54.

Utter, F.M., Ryman, N., 1993. Genetics markers and mixed stock fisheries. **Fisheries 18**: 11-21.

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

Vaughn, K.C., DeBonte, L.R., Wilson, K.G., 1980. Organelle alteration as a mechanism for maternal inheritance. **Science 208**: 196-7.

Verspoor, E., 1988. Reduced genetic variability in first generation hatchery populations of atlantic salmon (*Salmon salar*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45**: 1686-1690.

Vrijenhoek, R.C., Douglas, M.E., Meffe, G.K., 1985. Conservstion genetics of endangered fish populations in Arizona. **Science 229**: 400-402.

Vuorinen, J., 1984. Reduction of genetic variability in a hatchery stock of brown trout, *Salmo trutta*, L. **Journal of Fish Biology 24**: 339-348.

Zardoya, R, Garrido-Pertierra, A., Batista, J.M., 1995. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Mol. Evol. 41**: 942-951.

Zardoya, R., Meyer, A., 1996. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the lungfish (*Protopterus dolli*) supports its phylogenetic position as a close relative of land vertebrates. **Genetics 142**: 1249-1263.

Zardoya, R., Meyer, A., 1997. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of a "living fossil", the coelacanth (*Latimeria chalumanae*). **Genetics** **146**: 995-1010.

Zouros, E., Freeman, K.R., Ball, A.O., Pogson, G.H., 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. **Nature** **359**: 412-414.

Weitzman, S H & Weitzman, M J, 1982. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. *In*: **Biological Diversification in the Tropics**, Prance, T.G., (ed) Proceedings of the fifth international symposium of the association for tropical biology: pp. 403-422.

Weitzman, S. H., Menes, A., Weitzman, M. J., 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei, Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of the other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil, *In*: **Proceeding of a workshop on neotropical distribution**.

Weir, B.S., Cockerham, C.c., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** **38**: 1358-1370.

Whight, S., 1951. The genetical structure of populations. **Ann. Eugen.** **15**: 323-354.

Williams. J.E., Miller, R.R., 1990. Conservation status of the North American fish fauna in fresh water. **Journal of Fish Biology** **37A**: 79-85.

Wyman, A.R. & White, R., 1980. A highly polymorphic locus in human DNA.

**Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6754-6758.**

Wilson, G.M., Thomas, W.K., Beckenbach, A.T., 1985. Intra- and interspecific mitochondrial DNA sequence divergence in Salmon: rainbow, steelhead, and cutthroat trouts. **Can. J. Zool. 63: 2088-2094.**



## Apêndice 2

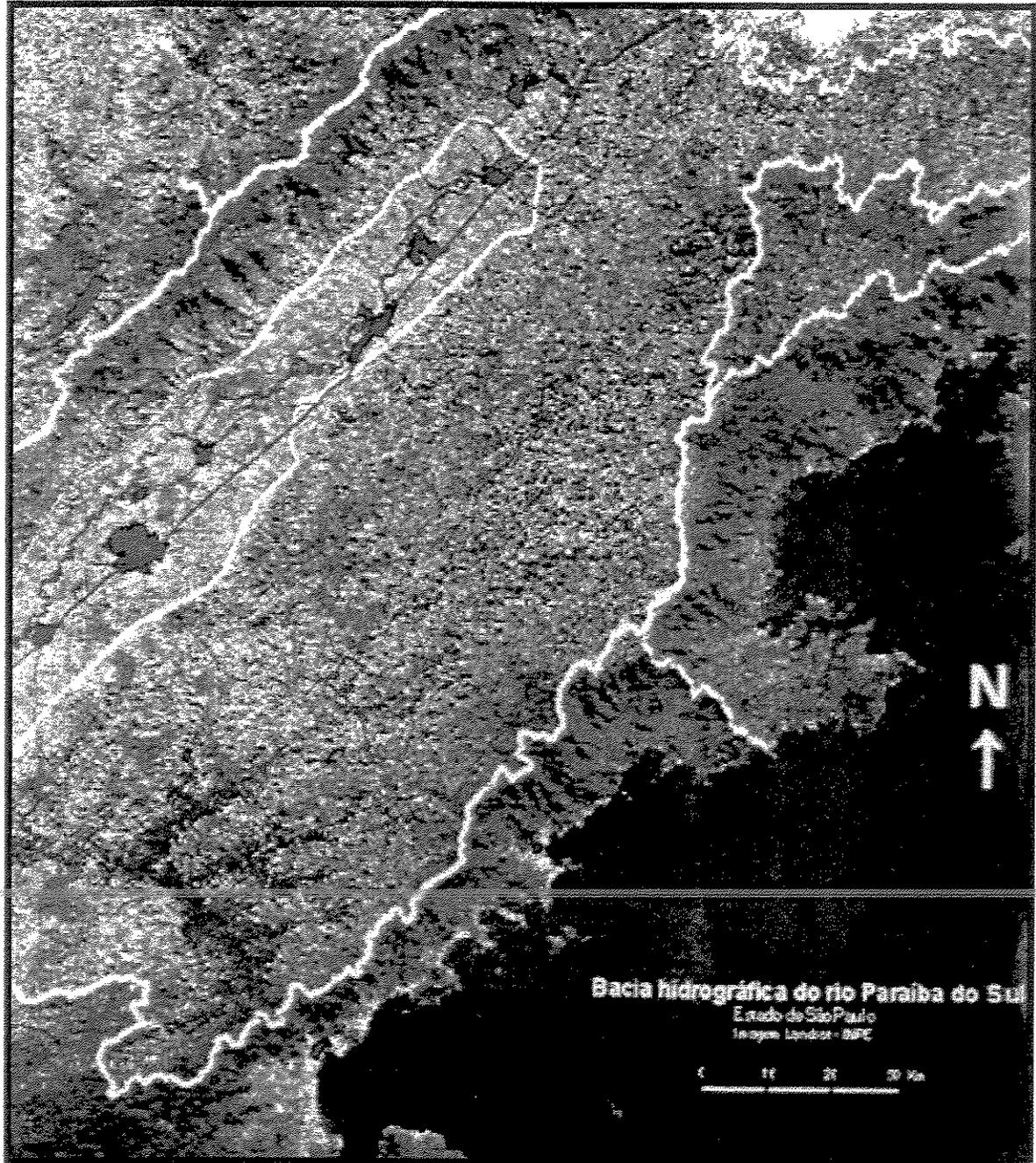
Espécies produzidas pelas Estações de Hidrobiologia e Aqüicultura da CESP

Nome Vulgar	Nome Científico	Período de Repovoamento	Total de Alevinos Repovoados
Apaiari **	<i>Astronotus ocellatus</i>	1975 a 1986	809.485
Bagre comum	<i>Rhandia</i> sp	1980 a 1985	279.124
Carpa*	<i>Cyprinus carpio</i>	1980 a 1984	5.742.132
Cascudo	Pogonopomoides parahibae	1992	40.000
Cascudo	<i>Rhinelepis aspera</i>	1991 e 1993	7.000
Curimbatá	<i>Prochilodus lineatus</i>	A partir de 1979	69.056.383
Dourado	<i>Salminus maxillosus</i>	1983/88/90/92/93/94 – 96/97	45.912
Jaú	<i>Paulicea luetkeni</i>	1992	500
Jurupecê	<i>Sorubim lima</i>	1981 a 1988 – 96/97	10.000
Lambari tambuiú/Lambari	<i>Astyanax bimaculatus</i>	1981 a 1988 – 96/97	10.825.907
Mandi	<i>Pimelodus maculatus</i>	1980	4.000
Pacu-guaçu	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	A partir de 1984	13.971.734
Pescada**	<i>Plagioscium squamosissimus</i>	1975 a 1977	11.800
Piabanha	<i>Brycon insignis</i>	A partir de 1990	412.075
Piapara	<i>Leporinus obtusidens</i>	A partir de 1982	1.791.500
Piapara bicuda	<i>Leporinus elongatus</i>	A partir de 1980	181.000
Piau branco	<i>Leporinus</i> sp	1994	6.000
Piau-palhaço	<i>Leporinus copelandi</i>	1991/94	49.800
Piava-três-pintas	<i>Schizodon boreli</i>	1980 a 1994	2.986.500
Piava bicuda	<i>Leporinus conirostris</i>	A partir de 1988	417.000
Piracanjuba	<i>Brycon orbignyanus</i>	1993 – 1995 a 1997	37.500
Pirapitinga-do-sul	<i>Brycon reinhardt</i>	A partir de 1982	3.122.186
Sardinha-de-água-doce**	<i>Triportheus angulatus</i>	1975 a 1990	17.245.650
Tilápia-do-nilo*	<i>Oreochromis niloticus</i>	1978 a 1987	39.085.648
Trairão**	<i>Hoplias lacerdae</i>	1975 a 1987	783.817
Truta arco-íris*	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1980 a 1982	370.852
<b>Total</b>			<b>167.293.505</b>

Espécies autóctones, exóticas\* e alóctones\*\* de utilizados para povoamento e repovoamento nos reservatórios da CESP

### Apêndice 3

Foto da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul



## Apêndice 4

### Protocolos para extração de DNA mitocondrial e DNA total

#### **A- Extração de DNA mitocondrial de acordo com o protocolo de Chapman & Powers, (1984):**

##### 1. Fonte de DNAm

- 1.1- De 0,5 a 5 g. de fígado (coração pode ser incluído), que deve ser cortado para facilitar a homogeneização. Homogeneizar em 10 ml de tampão TEKS (50 mM Tris, 10mM EDTA, 200 mM KCl; ph 7,7) em tubo *Falcon* de 50 ml.
- 1.2- O rendimento de DNA é menor por grama de ovo que por grama de fígado, porém, o DNAm obtido é mais puro. Desta forma, 50 a 60 ml de ovo são necessários para testar várias enzimas. 30 ml de ovo podem ser homogeneizado em 10 ml de tampão (TEKS) em tubo *Falcon* de 50 ml. Para melhor homogeneização adicionar o tampão TEKS imediatamente antes da homogeneização para evitar o endurecimento dos ovos.

##### 2. O tecido deve ser homogeneizado em tampão TEKS, em homogeneizador *motor drive teflon pestle*. A homogeneização deve ser realizada vagorosamente para que as células possam ser lisadas, porém, as mitocôndrias não. No caso de ovos passar o homogeneizado por um coador para remover as cascas dos ovos;

##### 3. Colocar o homogeneizado em tubos e centrifugue por 10 min. a 1.000 rpm em centrifuga refrigerada (4°C) para eliminar os resíduos;

4. Cuidadosamente passar o sobrenadante para um outro tubo e descartar o precipitado;
5. Colocar em cada amostra uma pipeta pasteur estéril através do homogeneizado e ponha cerca de 2 a 3 ml de tampão TEKS com mais 25% de sacarose para criar um gradiente. Centrifugar o gradiente por 10 min. a 2.000 rpm;
6. Cuidadosamente remover o sobrenadante para um tubo de polipropileno e centrifugar de 30 a 60 min. a 12.000 rpm para sedimentar mitocôndrias;
7. Remover os tubos do *rotor* imediatamente após a parada da centrifuga e descartar o sobrenadante. Este procedimento deve ser feito rapidamente e com cuidado para não desgrudar o precipitado do tubo;
8. Resuspender a parte marrom claro ao redor do precipitado com 10 ml de TEKS. Deve se ter cuidado para não remover a parte escura central do precipitado;
9. Centrifugar por 30 min a 12.000 rpm. Para o precipitado de mitocôndrias obtido a partir de ovos pode-se omitir esta etapa devido à pureza do preparado;
10. Descartar o sobrenadante e resuspender as mitocôndrias com 0.74 a 3.0 ml (dependendo o tamanho do precipitado) de TEKS;
11. Retirar um alíquota de 1 ml da solução de mitocôndria mais TEKS, e colocar em tubos eppendorf. Adicionar 150 ul de 10% *nonidet* (detergente NP-40) em TEKS. Misturar por inversão e incubar a temperatura ambiente por 10 min. A solução deve ficar clara quase transparente;

12. Centrifugar em centrífuga refrigerada por 10 min a 14.000 rpm para sedimentar restos mitocondriais e núcleo;
13. Aliquotar 750 µl do sobrenadante mais 750 µl de fenol em tubo *ependorf*, misturar por inversão e centrifugar por 10 min a 14.000 rpm;
14. Se o sobrenadante aparecer como uma massa branca, deve se retirar a massa e proceder uma nova centrifugação;
15. Adicionar ½ volume de fenol e ½ volume de cloroformio-isoamílico (24:1) à solução aquosa retirada do item 14 e centrifugar;
16. Retirar o sobrenadante e adicionar 1 volume de cloroformio-isoamílico (24:1) à solução e centrifugar;
17. Aliquotar 500 µl do sobrenadante em tubos *ependorf* e adicionar 0.3 M de Acetato de Sódio mais 2 volumes de etanol absoluto gelado;
18. Deixar durante a noite a -20°C ou por 2 horas a -80°C;
19. Centrifugar a solução do item 18. Lavar o precipitado com etanol 70% e secar;
20. Adicionar o volume apropriado (depende do tamanho do precipitado) de TE 1X ( 10mM Tris, 1,0 mM EDTA, pH 7,5), e resuspende o precipitado em geladeira (4°C) por 1 ou mais dias.

**B- Extração de DNA total a partir de tecido muscular de acordo com o protocolo de Taggart *et al.*, (1992):**

1. Cortar 100 mg de músculo e colocar em 500  $\mu$ l de tampão STE (0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA, pH 8,0);
2. Adicionar ao tampão 30  $\mu$ l de SDS 10% e 10  $\mu$ l de proteinase K (20mg/ml);
3. Incubar a 50°C por aproximadamente 1 hora, ou até que o tecido esteja totalmente digerido. Misturar a solução por inversão freqüentemente para acelerar o processo de digestão;
4. Adicionar 500  $\mu$ l de fenol, misturar por inversão e centrifugar por 10 min. a 14.000 rpm;
5. Retirar o sobrenadante e adicionar 500  $\mu$ l de fenol:clorofórmio-isoamílico. Misturar por inversão e centrifugar por 10 min a 14.000 rpm;
6. Precipitar o DNA com 0.3 M de Acetato de sódio e 2 volumes de etanol absoluto;
7. Deixar a -20°C durante a noite ou por 2 horas a -80 °C;
8. Centrifugar por 30 min a 14.000 rpm em centrifuga refrigerada;
9. Secar e ressuspender com quantidades apropriada de TE 1X.

## Apêndice 5

### Fórmulas utilizadas para análise genética

#### 1. Diversidade haplotípica (h)

$$h = 2n (1 - \sum X_i^2) / (2n - 1) - (\text{eq. 8.4; Nei, 1987})$$

onde:

$x_i$  = frequência do haplótipo  $x$  na amostra

$n$  = tamanho da amostra

#### 2. Diversidade nucleotídica ( $\pi$ )

$$\pi = 2 \sum d_{ij} / [n (n - 1)] - (\text{eq. 1; Nei & Miller, 1990})$$

onde:

$n$  = número de haplótipos

$$d_{ij} = \sum (k) m_k r_k d_{ij}(k) / \sum (k) m_k r_k - (\text{eq. 4; Nei & Miller, 1990})$$

$k$  = número de classes de enzimas de restrição

$m$  = número de sítios de restrição produzidos por uma dada enzima

$r$  = número de bases de reconhecimento de sítio da enzima de restrição

$$d_{ij} = (-\log_e S_{ij}) / r - (\text{eq. 3; Nei & Miller, 1990})$$

$$S_{ij} = 2m_{ij} / m_i + m_j - (\text{eq. 2; Nei & Miller, 1990})$$

$m_{ij}$  = número de sítios de restrição compartilhados entre os haplótipos  $i$  e  $j$

$m_i$  = número de sítios de restrição do haplótipo  $i$

$m_j$  = número de sítios de restrição do haplótipo  $j$

#### 3. Divergência nucleotídica ( $\sigma$ )

$$\sigma = \pi_{xy} - (\pi_x + \pi_y) / 2 - (\text{eq. 10.21; Nei, 1987})$$

#### 4. Índice de $F_{st}$ de Wright

$$F_{st} = 1 / (1 - 2Nm) - (\text{Weir & Cockerham, 1984})$$

Onde:

$N$  = tamanho efetivo populacional

$M$  = taxa de migração

$$0 \leq F_{st} \leq 1$$